

**UFSC
CCA
PGCAL**

**Universidade Federal de Santa Catarina
Programa de Pós-Graduação em
Ciência dos Alimentos**

TESE

Célia Maria Teixeira de Campos

**AVALIAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS
E DE ELEMENTOS NUTRITIVOS
ESSENCIAIS EM OVOS DE GALINHA
EMBRIONADOS E LIOFILIZADOS**

Célia Maria Teixeira de Campos

Tese de Doutorado

2002

**Florianópolis
2002**

Célia Maria Teixeira de Campos

**AVALIAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS E DE ELEMENTOS
NUTRITIVOS ESSENCIAIS EM OVOS DE GALINHA
EMBRIONADOS E LIOFILIZADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, como um dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Ciência dos Alimentos. Área de concentração: Bromatologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio José Simões Hamad.

Florianópolis
2002

Célia Maria Teixeira de Campos

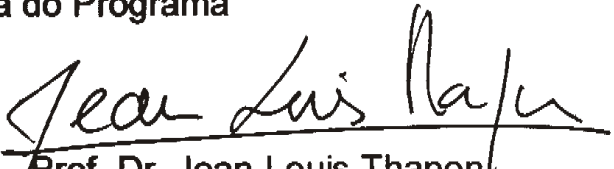
**AVALIAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS E DE ELEMENTOS
NUTRITIVOS ESSENCIAIS EM OVOS DE GALINHA
EMBRIONADOS E LIOFILIZADOS**

Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do grau de **Doutor em
Ciência dos Alimentos**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência dos
Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 28 de novembro de 2002.


Prof.^a Dr.^a Roseane Fett
Coordenadora do Programa


Prof. Dr. Antônio José Simões Hamad
Universidade Federal de Santa Catarina
Orientador no Brasil


Prof. Dr. Jean-Louis Thapon
École Nationale Supérieure Agronomique
Rennes – França
Orientador na França

BANCA EXAMINADORA


Prof.^a Dr.^a Cláudia Maria Oliveira Simões
Universidade Federal de Santa Catarina
Relatora


Prof.^a Dr.^a Alda Luiza Santos Lerayer
Instituto de Tecnologia de Alimentos
Campinas/ SP


Prof. Dr. José Carlos Fiad Padilha
Universidade Federal de Santa Catarina


Prof.^a Dr.^a Hélène-Marie Thérien
Université du Québec à Trois Rivières
Canadá



Agradecimentos

Aos meus pais, Nuno e Maria da Glória, pela suprema felicidade da vida.

Ao meu orientador, professor e amigo, Doutor Antônio José Simões Hamad, que me acolheu, acreditou no meu trabalho, e me apoiou nas dificuldades.

Aos professores e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CAL/ UFSC), que me proporcionaram essa oportunidade.

Aos colegas do Departamento de Ciências Farmacêuticas (CIF/ UFSC), pelo apoio e estímulo.

Aos professores e funcionários do Departamento de Zootecnia (ZOT/ UFSC), do Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC (MIP/ CCB e CIF/ CCS), do Departamento de Informática e Estatística (INE/ UFSC) e do Laboratório de Óleos e Gorduras/ FEA/ UNICAMP, pelo auxílio e amizade.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório Central (LACEN/ SES/ SC) e Laboratório Industrial Farmacêutico (LAFESC/ SES/ SC), pelo incentivo.

Aos colegas de curso, os quais, pela convivência, se tornaram amigos.

A todos que colaboraram, direta e indiretamente, na realização desse trabalho.

Locais onde foram realizados os experimentos:

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CAL/ CCA/ UFSC).

Departamento de Zootecnia – Aviário e Laboratório de Avicultura (ZOT/ CCA/ UFSC).

Departamento de Ciências Farmacêuticas (CIF/ CCS/ UFSC).

Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC (MIP/ CCB e CIF/ CCS).

Departement Agroalimentaire – École Nationale Supérieure Agronomique (ENSA) – Rennes – França.

Laboratoire de Recherches de Technologie Laitière – Dosage des Minéraux – Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) - Rennes – França.

Laboratório de Óleos e Gorduras – Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA/ UNICAMP).

Sumário

Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xiii
Resumo	xiv
Le résumé	xv
Abstract	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Potencialidades tecnológicas dos ovos embrionados de galinha	2
1.1.1 Resumo	2
1.1.2 Metodologia	2
1.1.3 Prospecção mercadológica	4
1.1.1.1 Leitura técnica da árvore	4
1.1.1.2 Utilização industrial e comercial	6
2 REVISÃO DA LITERATURA	8
2.1 Dados históricos, propriedades terapêuticas e nutritivas	8
2.2 Proteínas	10
2.3 Ácidos graxos ω -3 e ω -6	12
2.4 Ácido siálico	15
2.5 Desenvolvimento do embrião de galinha	16
2.5.1 Gametogênese	16
2.5.2 Fecundação	17
2.5.3 Desenvolvimento	19
2.5.4 Eclosão	22
2.6 Importância dos lipídios no desenvolvimento do embrião	23
2.6.1 Transferência dos ácidos graxos	24
2.6.2 Transformações bioquímicas no saco vitelínico	25
2.6.3 Lipídios plasmáticos	26
2.6.4 Enzima lipoproteína lipase	27
2.6.5 Tecido adiposo subcutâneo	27
2.6.6 Órgãos embrionários	28
3 OBJETIVOS	30

4	OBTENÇÃO DE AMOSTRAS	31
4.1	Obtenção dos ovos embrionados	31
4.2	Liofilização	34
5	AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA: Atividade de inibição ao crescimento de <i>Salmonella enteritidis</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	36
5.1	Resumo	36
5.2	Metodologia	36
5.2.1	Preparo das unidades amostrais	37
5.2.2	Teste de esterilidade das amostras	37
5.2.3	Preparação dos inóculos	37
5.2.4	Inoculação	38
5.2.5	Contagem de <i>Salmonella enteritidis</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	38
5.3	Resultados e discussão	38
6	AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	41
6.1	Determinação de aminoácidos e do perfil protéico	41
6.1.1	Resumo	41
6.1.2	Metodologia	42
6.1.2.1	Composição de aminoácidos	42
6.1.2.2	Perfil protéico por CLAE – fase reversa	42
6.1.2.3	Perfil protéico por eletroforese SDS – PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio)	43
6.1.2.4	Perfil protéico por eletroforese de focalização isoeétrica	43
6.1.3	Resultados e discussão	44
6.2	Determinação de ácidos graxos ω -3 e ω -6	52
6.2.1	Resumo	52
6.2.2	Metodologia	52
6.2.2.1	Composição em ácidos graxos	52
6.2.2.2	Delineamento estatístico	53
6.2.3	Resultados e discussão	53
6.3	Determinação dos elementos minerais (potássio, sódio, magnésio e cálcio)	59
6.3.1	Resumo	59
6.3.2	Metodologia	59
6.3.2.1	Teor dos elementos minerais	59
6.3.2.2	Delineamento estatístico	60
6.3.3	Resultados e discussão	60
6.4	Determinação de ácido siálico	63
6.4.1	Resumo	63
6.4.2	Metodologia	63
6.4.2.1	Determinação dos teores dos ácidos siálicos	63
6.4.2.2	Delineamento estatístico	64
6.4.3	Resultados e discussão	64

7	CONSIDERAÇÕES FINAIS, CONCLUSÕES E PROPOSTAS DE PESQUISAS	68
7.1	Considerações finais	68
7.2	Conclusões	70
7.3	Propostas de pesquisas futuras	71
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	72
	ANEXOS.	80
	Anexo 1.	81
	Anexo 2.	87
	Anexo 3.	93
	Anexo 4.	102
	Anexo 5.	109
	Anexo 6.	117

Lista de figuras

Figura 1:	Árvore tecnológica de ovos embrionados de galinha.	4
Figura 2:	Ovo embrionado de galinha com 7 dias de incubação.	5
Figura 3:	Gaiola móvel com galinhas poedeiras da linhagem <i>Isa Brown</i> do Departamento de Zootecnia – CCA/ UFSC – 2000.	31
Figura 4:	Alimentação das galinhas poedeiras da linhagem <i>Isa Brown</i> do Departamento de Zootecnia – CCA/ UFSC – 2000	32
Figura 5:	Coleta de ovos férteis de galinhas poedeiras da linhagem <i>Isa Brown</i> do Departamento de Zootecnia – CCA/ UFSC – 2000	33
Figura 6:	Incubação de ovos férteis de galinhas poedeiras da linhagem <i>Isa Brown</i> Departamento de Zootecnia – CCA/ UFSC – 2000	34
Figura 7:	Unidades amostrais (30g) de ovos galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação.	35
Figura 8:	Crescimento de <i>Salmonella enteritidis</i> inoculada em ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de desenvolvimento em TSA, após 48 horas de incubação a 30°C. Inoculo inicial 10 ⁷ UFC/ mL.	39
Figura 9:	Crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> inoculado em ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de desenvolvimento em TSA, após 48 horas de incubação a 30°C. Inoculo inicial 10 ⁵ UFC/ mL.	40
Figura 10:	Caracterização de ovos de galinha embrionados e liofilizados, com diferentes dias de incubação, por CLAE – fase reversa.	45
Figura 11:	Caracterização de ovos de galinha embrionados e liofilizados, com diferentes dias de incubação, por eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% SDS – PAGE (coloração Coomassie blue) . . .	47

Figura 12:	Caracterização de ovos de galinha embrionados e liofilizados, com diferentes dias de incubação, por eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% SDS – PAGE (coloração nitrato de prata).	48
Figura 13:	Caracterização de ovos de galinha embrionados e liofilizados, com diferentes dias de incubação, por eletroforese de focalização isoeétrica (pH 3-7).	50
Figura 14:	Teor de ácidos graxos ω -3 e ω -6 versus dias de incubação em ovos de galinha embrionados e liofilizados.	55
Figura 15:	Diagrama de dispersão do teor médio de DHA (%) em unidades amostrais de ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação.	57
Figura 16:	Variação dos elementos minerais com tempo de incubação (dias).	61
Figura 17:	Teores médios dos ácidos siálicos livres em ovos de galinha embrionados e liofilizados versus diferentes dias de incubação.	64
Figura 18:	Diagrama de dispersão dos teores dos ácidos siálicos em unidades amostrais de ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação.	66

Lista de tabelas

Tabela 1:	Média da composição em aminoácidos (g/kg) em unidades amostrais de ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação.	44
Tabela 2:	Média da composição em ácidos graxos em unidades amostrais de ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação.	54
Tabela 3:	Análise de variância com contrastes do teor total em ácidos graxos ω -3 e ω -6 em ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação.	56
Tabela 4:	Análise de regressão do teor de DHA em ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação	57
Tabela 5:	Média do teor dos minerais (ppm) em unidades amostrais de ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação . .	60
Tabela 6:	Análise de variância com contrastes dos teores médios dos minerais K, Na, Mg e Ca em ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação.	61
Tabela 7:	Análise de regressão dos teores dos ácidos siálicos em ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação	65

Resumo

CAMPOS, Célia Maria Teixeira. **Avaliação de substâncias ativas e de elementos nutritivos essenciais em ovos de galinha embrionados e liofilizados.** 2002. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, UFSC, Florianópolis.

Os ovos embrionados vêm sendo utilizados por habitantes de diversas regiões do Brasil no tratamento de patologias graves de origem bacteriana como a tuberculose, porém sem comprovação científica. Visando validar cientificamente esse hábito popular e secular, propõe-se investigar algumas substâncias ativas e elementos nutritivos essenciais nos ovos embrionados, a fim de contribuir para o estudo das potencialidades de utilização dos mesmos no desenvolvimento de alimentos e/ou medicamentos. Os ovos de galinha liofilizados férteis e embrionados, produzidos nesse trabalho, estavam em condições higiênico-sanitárias satisfatórias e verificou-se que os mesmos não apresentaram mecanismos de resistência ao crescimento de *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus*. Também foram avaliadas, a composição dos aminoácidos e a caracterização protéica por CLAE-fase reversa, eletroforese SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio) e eletroforese de focalização isoelétrica. As diferenças na composição aminoacídica não foram significativas, com exceção do aminoácido prolina. O perfil protéico desses ovos apresentou variações, sendo que as diferenças ficaram mais evidentes a partir do 5^o dia de desenvolvimento, onde há um aumento da concentração das proteínas ovoalbumina, ovotransferrina, apoLDL, apoHDL e lisozima, e diminuição da concentração das proteínas ovomucina e ovostatina. Após a avaliação da composição em ácidos graxos ω -3 (ácido docosahexaenóico - DHA) e ω -6 verificou-se que não houve diferença significativa nos teores médios totais de ácidos graxos ω -3 ($p=0,1226$), entre os ovos embrionados liofilizados com diferentes dias de incubação (3, 5, 7, 9, e 11 dias) e ovos férteis liofilizados (dia 0). Porém, houve diferença significativa nos teores médios totais de ácidos graxos ω -6 ($p=0,0001$). A determinação da composição em elementos minerais (K, Na, Mg e Ca) dos ovos embrionados apresentou os seguintes resultados: potássio ($7728,06 \pm 179,01$ ppm), sódio ($5217,62 \pm 194,19$ ppm), magnésio ($521,35 \pm 52,11$ ppm) e cálcio ($3019,43 \pm 130,58$ ppm). Verificou-se que os ovos embrionados são fontes de ácido siálico.

Palavras-chave: ovos embrionados de galinha, mecanismos de resistência, composição de aminoácidos, CLAE-fase reversa, eletroforese SDS-PAGE, eletroforese de focalização isoelétrica, ácidos graxos ω -3 e ω -6, DHA, elementos minerais (K, Na, Mg, Ca), ácido siálico.

Abstract

CAMPOS, Célia Maria Teixeira. **Evaluation of active substances and of essential nutritional elements in freeze-dried chicken embryo eggs.** 2002. Thesis (Doctorate in Food Science) – Course of Doctorate in Food Science, UFSC, Florianópolis.

The chicken embryo eggs have been used by Brazilian Amazon area inhabitants as a treatment for serious bacterial origin pathologies such as tuberculosis, but this has not been scientifically proved yet. Trying to prove scientifically these popular and secular uses, we intend to search some active substances and essential nutritional elements in chicken embryo eggs, in order to contribute to the study of potential uses in the development of foods and/or medicines. Freeze-dried chicken fertile eggs and freeze-dried chicken embryo eggs, used in this experiment, were in satisfactory sanitary conditions and we have determined that they do not have resistance mechanisms to the growth of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus*. We also determined the aminoacid composition and protein profile by HPLC-reverse phase, electrophoresis SDS-PAGE and isoelectric focusing electrophoresis. We have not noticed differences in aminoacid composition except for amino acid proline. The protein profile in these eggs was not equal and the difference was more evident following the 5th day of development, where there was an increase in ovalbumin, ovotransferrin, apoLDL, apoHDL, lysozyme concentration and there was a decrease in ovomucin and ovostatin concentration. The presence of fatty acids, ω -3 (DHA) and ω -6, was determined. We verified that there were no significant differences in total medium content of ω -3 fatty acids ($p=0.1226$), between freeze-dried chicken embryo eggs with different incubation periods (3, 5, 7, 9 and 11 days) and fertile freeze-dried eggs (day 0). However, there were significant differences in total medium content of ω -6 fatty acids ($p=0.0001$). Some mineral content was determined. According to the obtained results, embryo eggs presented the following averages: K (7728.06 ± 179.01 ppm), Na (5217.62 ± 194.19 ppm), Mg (521.35 ± 52.11 ppm) and Ca (3019.43 ± 130.58 ppm). We also verified that chicken embryo eggs can be a source of sialic acid.

Key words: chicken embryo eggs; resistance mechanisms; aminoacid composition; HPLC-reverse phase; electrophoresis SDS-PAGE; isoelectric focusing electrophoresis; ω -3 and ω -6 fatty acids; DHA; mineral content (K, Na, Mg, Ca); sialic acid.

1 INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, na sua mais variada forma, os ovos de galinha (não fecundados, férteis e embrionados), *Gallus gallus domesticus* L., têm sido empregados na alimentação e na terapia de doenças. Sob o ponto de vista nutritivo, os ovos sempre foram um dos alimentos mais completos e baratos que o homem teve à sua disposição (Thapon e Bourgeois, 1994). Dos três elementos essenciais para uma boa dieta (proteínas, lipídios e carboidratos), os ovos contêm, principalmente, os dois primeiros, além de incluir vitaminas e minerais (Beig e Garcia, 1986). O ovo foi concebido para a geração de uma nova vida, o que justifica a sua complexa e completa composição, altamente nutritiva, por isso se tornando um alimento.

Muitos pesquisadores têm relatado a utilização de ovos como veículo de vários nutrientes e como fonte de substâncias ativas para uso terapêutico e de diagnóstico (Stadelman, 1999).

Textos antigos, métodos empíricos e a cultura popular relatam a utilização de ovos embrionados de galinha para o tratamento de infecções graves como a tuberculose. Na região amazônica brasileira são usadas as “*garrafadas*”, feitas com ovos embrionados, para serem ingeridas por pessoas enfraquecidas visando a seus restabelecimentos. Observa-se que algumas pessoas melhoram, outras convalescem, outras continuam na mesma, e outras até pioram, levando a alguns questionamentos: O que leva à melhora das pessoas? Será alguma substância ativa ou será simplesmente a ingestão de um alimento completo? Serão ambas as coisas, ou nenhuma delas? Os ovos embrionados ingeridos têm quantos dias de incubação?

É mister validar cientificamente esse hábito popular e secular. Com o objetivo de contribuir, parcial e preliminarmente, para essa validação propõe-se investigar quali e quantitativamente algumas substâncias ativas e elementos nutritivos essenciais em ovos embrionados, apontando suas potencialidades.

Algumas substâncias ativas isoladas dos ovos como: a lisozima, a avidina, a fosvitina, o ácido siálico e os anticorpos IgY têm demonstrado potencialidades no desenvolvimento de pesquisas de diversos campos terapêuticos e diagnósticos (Hartmann e Wilhelmson, 2001). Outros componentes dos ovos, os ácidos graxos polinsaturados, também têm sido estudados, pois apresentam potenciais nutricionais e

terapêuticos (Nettleton, 1995; Boutonnier e Poligny, 2000). Os ovos embrionados de galinha podem, então, ser uma fonte destas substâncias.

O trabalho pretende ainda avaliar: a atividade antimicrobiana de ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de desenvolvimento para o controle ou inativação de *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus*, a quantidade de aminoácidos totais e o perfil protéico da matéria-prima, os teores dos ácidos graxos ω -3 e ω -6 e dos elementos minerais e, finalmente, a quantidade de ácido siálico.

1.1 Potencialidades tecnológicas dos ovos embrionados de galinha

Potencialidades tecnológicas do embrião de galinha (*Gallus gallus domesticus* L.) é o título do artigo publicado na revista **Ciências da Saúde**, v.18, n.1/2, p.70-74, 1999 (ISSN 0101-9546), visando a apresentar o potencial do ovo nas suas mais diversas formas (Anexo 1, p.81). O artigo foi assim publicado:

1.1.1 Resumo

Este trabalho reúne informações sobre as principais potencialidades tecnológicas de ovos embrionados de galinha. Foi utilizada como ferramenta a árvore de desenvolvimento tecnológico.

Constatou-se que esse assunto, pelo menos no Brasil, ainda é incipiente, sendo enorme o campo de pesquisa a ser prosseguido nesta área.

Palavras-chave: ovos embrionados de galinha, desenvolvimento tecnológico.

1.1.2 Metodologia

A metodologia utilizada neste trabalho, visando a mostrar o potencial tecnológico dos ovos embrionados de galinha, foi desenvolvida por Hamad (1992). Consiste na elaboração de uma árvore de desenvolvimento tecnológico, também chamado "*bonzai tecnológico*" (Figura 1).

Utilizou-se como objeto de estudo: a casca, a gema, a clara e o embrião. A eles aplicou-se a técnica onde se pretendia obter o máximo de possibilidades do uso do todo, partes e componentes. Para isso, seguiu-se os procedimentos:

- Raiz: nesta região relacionam-se as ciências e as tecnologias genéricas.
- Tronco: nesta região relacionam-se as tecnologias específicas (potencial tecnológico e industrial).
- Ramos: nesta região relacionam-se as técnicas genéricas e/ou técnicas especiais.
- Galhos: nesta região relacionam-se as técnicas específicas.
- Frutos: nesta região relacionam-se os produtos obtidos.

O modelo convencionado denomina técnica ao conhecimento de uma maneira de fazer específica (*know-how*) e tecnologia como o conjunto de técnicas que tem como objetivo a transformação de uma matéria-prima em um produto acabado, no âmbito de um contexto econômico.

1.1.3 Prospecção mercadológica

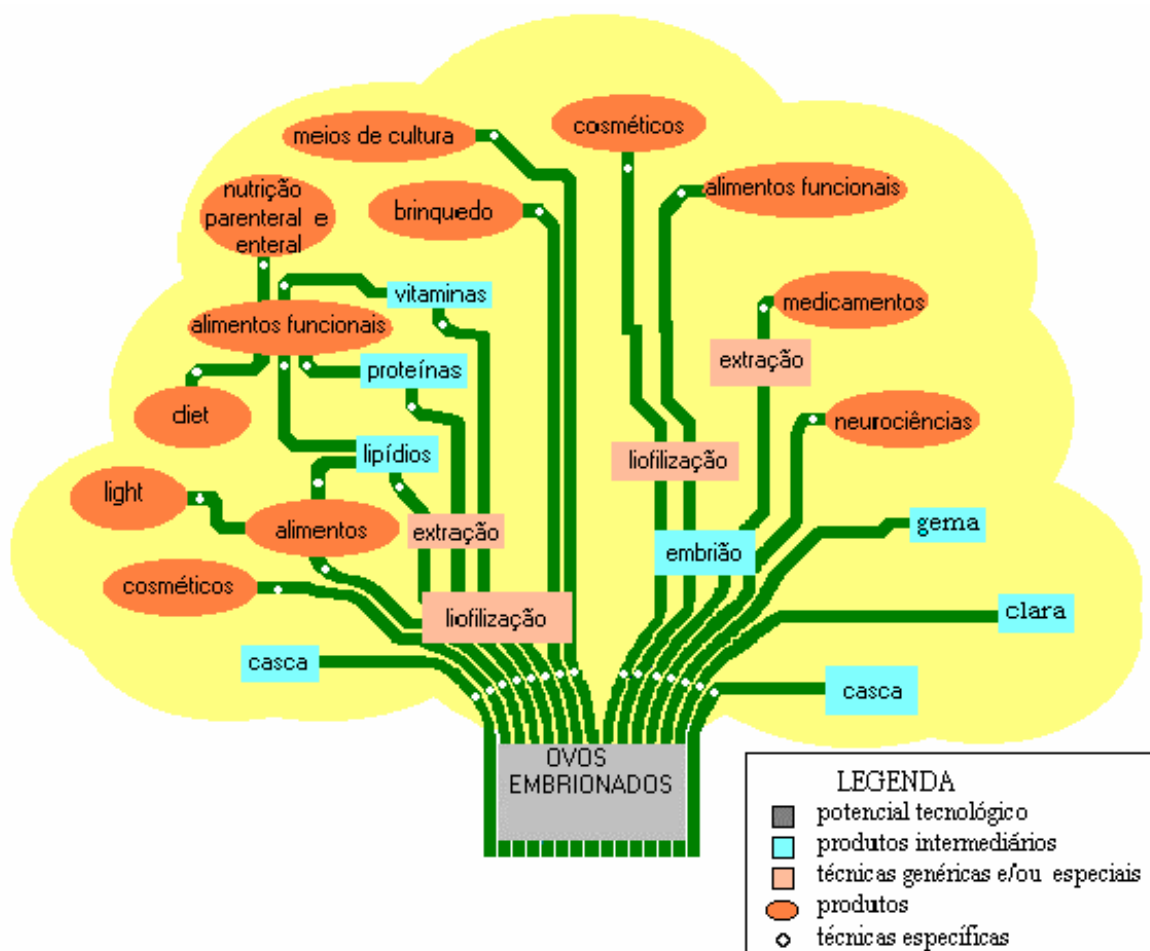


Figura 1: Árvore tecnológica de ovos embrionados de galinha

1.1.3.1 Leitura técnica da árvore

Os ovos férteis, embrionados e não fecundados de galinha, têm sido considerados como alimentos humanos importantes como o leite, pois são nutritivos, fáceis de preparar e de fácil digestão. Há alguns anos, no entanto, a ciência começou a avaliar esses produtos pelas suas qualidades terapêuticas e nutritivas (Schneider, 1999).

O ovo não fecundado é tido como um vilão, pois o conteúdo de colesterol encontrado na gema é considerado alto e induz o consumidor a precaver-se contra

problemas de saúde. Os ovos embrionados não sofrem estigma, no entanto, outros fatores inibem seu consumo:

- A conservação é quase impossível. A cada dia que passa o embrião está numa fase de desenvolvimento diferente.
- Qualquer que seja o processo de transformação, o risco de alterações das substâncias constituintes é importante.
- A distribuição é dificultada pela fragilidade de um modo geral.
- *In natura* seu aspecto chega a ser repugnante, testemunhado pela Figura 2.



Figura 2: Ovo embrionado de galinha com 7 dias de incubação

Justifica-se a escolha da liofilização como sendo um método ideal para a conservação deste produto, pois o mesmo resolve praticamente todos os problemas citados. Os constituintes dos ovos embrionados de galinha são altamente sujeitos a alterações por vários agentes, como o calor, o oxigênio e a umidade, e graças ao congelamento brusco e intenso, ao qual o material é submetido, conservam-se as propriedades que possuíam no momento do congelamento, mantendo-se integralmente após secas por sublimação do gelo formado. A liofilização transforma o produto em pó, facilitando a conservação e a distribuição.

Na árvore tecnológica (Figura 1), verifica-se a multiplicidade de utilidades dos ovos embrionados de galinha. O primeiro passo é a separação da casca. Esta pode ser utilizada no preparo de rações para animais, adubos para plantas e outros usos.

A árvore (Figura 1), divide-se em dois grandes ramos:

- O ramo da esquerda, onde é sugerido o processo de liofilização do embrião acompanhado da gema e clara.
- O ramo da direita, onde o embrião é separado destes componentes.

1.1.3.2 Utilização industrial e comercial

Os grupos de produtos são mostrados da seguinte maneira:

No ramo da esquerda, o embrião é liofilizado juntamente com a gema e a clara. O produto obtido pode ser utilizado:

- Como matéria-prima na indústria de cosméticos no preparo de xampus, cremes restauradores da queratina capilar, bases para maquiagem, entre outros.
- Na indústria de alimentos como ingrediente no preparo de maionese, molhos para salada, bolos, biscoitos, cereais, farinhas, leite em pó, sobremesas (flan, pudim), docinhos, sopas, salgadinhos, massas e potes para bebê.
- Na extração de lipídios, obtendo-se um concentrado protéico livre de gorduras (incluindo o colesterol) para a indústria de alimentos tipo *light* e ácidos graxos essenciais que poderão ser utilizados como matéria-prima de alimentos funcionais.
- As proteínas e vitaminas que poderão ser utilizadas na fabricação de alimentos funcionais, nutrição enteral (incluindo dietas para astronautas, mergulhadores, alpinistas, etc), nutrição parenteral e também alimentos dietéticos tipo *diet*.
- O todo serve também na formulação de meios de cultura para inóculos de bactérias e vírus.

No ramo da direita o embrião é separado da gema, da clara e da casca:

- A gema e a clara podem ser utilizadas de diversas formas na indústria: líquidas, congeladas, desidratadas por atomização ou por liofilização, no preparo de diversos tipos de alimentos.
- O embrião isolado pode servir de substrato em pesquisas na área de neurociências e como matéria-prima na extração de substâncias ativas para indústrias

farmacêuticas apresentadas aos pacientes na forma de soluções, suspensões, pós, comprimidos e cápsulas. Também, pode sofrer um processo de liofilização e servir de adjuvante no preparo de medicamentos e cosméticos como loções e cremes rejuvenescedores.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Dados históricos, propriedades terapêuticas e nutritivas

Segundo Speake et al. (1998), as primeiras pesquisas com ovos embrionados de galinha foram realizadas por Aristóteles, século IV a.C. Durante o período medieval, quase não se tem informações de experimentos sobre esse tema. Os grandes avanços foram conseguidos somente durante o período do Renascimento, como na maioria das áreas da ciência, nos séculos XVI e XVII, quando o embrião de galinha foi amplamente estudado pelos biólogos, Willian Harvey e Marcello Malpighi.

No final do século XIX, houve um aumento da disponibilidade de acesso ao estudo de aves domésticas e o embrião de galinha se tornou um organismo clássico para a pesquisa da embriologia de vertebrados (Speake et al., 1998).

Em 1948, pesquisadores relataram problemas com o consumo e com a qualidade de ovos, sendo entendido, na época, como qualidade as condições da casca, clara e gema (Stadelman, 1999).

Atualmente, as galinhas, a gema do ovo, os ovos embrionados e o embrião têm sido utilizados em pesquisas de diversos campos terapêuticos e de diagnósticos.

No *Second International Symposium on Egg Nutrition and Newly Emerging Ovo-Biotechnologies*, que aconteceu em abril de 1998, no Canadá, muitos pesquisadores relataram a utilização de ovos como veículo de vários nutrientes e o seu uso como fonte de substâncias ativas (Stadelman, 1999). Hartmann e Wilhelmson (2001) mencionam que a gema do ovo contém muitas destas substâncias.

Pesquisas recentes têm mostrado métodos de isolamento, purificação e identificação de anticorpos específicos da gema do ovo, com aplicações nos campos veterinário e farmacêutico, onde as galinhas são expostas aos microrganismos para produzir anticorpos que estão presentes na gema. Essas pesquisas são relevantes não somente para a produção de anticorpos para fins terapêuticos em programas de vacinação passiva, como também para diagnósticos imunológicos. As imunoglobulinas das galinhas têm propriedades físico-químicas diferentes das dos anticorpos de mamíferos, diminuindo o risco de interações falso-positivos em diagnósticos imunológicos (Svedsen et al., 1995). As mais interessantes pesquisas com os anticorpos da gema têm sido realizadas no tratamento da síndrome da imunodeficiência

adquirida (AIDS). Galinhas têm sido tratadas com o vírus HIV para produzir ovos com anticorpos contra esse vírus (Stadelman, 1999).

Os ovos embrionados de galinha têm sido utilizados em pesquisas como padrão de formação do desenvolvimento do cérebro, comportamento, mecanismo da memória e outros aspectos do desenvolvimento psíquico na embriogênese, além de ser o sistema mais econômico e prático de cultivo para a produção de vacinas contra o vírus da gripe. Foi descoberto que esse vírus se adapta e se replica nas células da membrana carioalantoínica e nos fluidos destes ovos (Hardy et al., 1995; Speake et al., 1998).

Segundo Hardy et al. (1995), podem existir dois mecanismos nos ovos embrionados que permitem a seleção de variantes de vírus: um é em nível celular, onde certas células fornecem vantagens para determinadas populações de vírus, e o outro, em nível extra-celular, onde existem os fluidos amnióticos e alantoínicos, esses contêm inibidores moleculares que suprimem a replicação de certas populações de vírus. Há receptores específicos na superfície das células da membrana carioalantoínica, que promovem a ligação com certas populações de vírus enquanto outras moléculas presentes nos fluidos do ovo embrionado podem selecionar outras populações virais. Uma descoberta importante foi que as camadas de tecido da membrana cariolantoínica são compostas por células que contêm ácido siálico.

Dannhardt et al. (1996) mencionam ainda que a membrana carioalantoínica do embrião de galinha tem atividade antiinflamatória e está sendo utilizada em pesquisa para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos.

Segundo Ariki et al. (1999), os ovos de galinha (não fecundados, férteis e embrionados) são considerados como um dos alimentos mais completos do ponto de vista nutricional. O ovo é um alimento básico a muitas populações ao redor do mundo.

O ovo de galinha é constituído de uma casca (9% do seu peso), da clara (62% do seu peso) e da gema (29% do seu peso). É um alimento tradicional apreciado pela: simplicidade de sua utilização, sua qualidade nutricional (rico em proteínas, vitaminas, minerais e oligoelementos) e seu baixo custo (Croguennec, 2000).

Para o nutricionista, a principal característica do ovo de galinha é seu aporte de proteínas. Um ovo inteiro sem a casca contém de 13 a 14% de proteínas e as mesmas são de um excelente valor biológico. Os ovos são ricos em fósforo e ferro, são pobres

em cálcio e quase não contêm glicídios (menos de 1%). Esses glicídios apresentam-se livres e combinados (polissacarídeos). O ovo inteiro de galinha sem casca contém 12% de lipídios. Eles estão localizados na gema. Os esteróis representam em torno de 5% de lipídios totais do ovo. Os ovos aportam vitamina A em quantidade apreciável. A vitamina A, a vitamina D e a tiamina (B₁) estão localizadas na gema. O teor de vitaminas no ovo varia em função de diversos fatores, principalmente da alimentação das galinhas (Stadelman e Pratt, 1989).

A maioria dos nutrientes dos ovos de galinha estão presentes em uma quantidade variável que depende da maneira de criar e alimentar as aves. Nesses incluem o colesterol, aminoácidos, proteínas, lipídios, Ca, P, Fe, Na, K, Cl, Mg, ácido palmítico, esteárico, araquidônico e ácidos graxos ω -3 (Thapon, 1981).

Um ovo de galinha aporta 100 mg de colesterol. É prudente aconselhar as pessoas que têm uma taxa sangüínea de colesterol elevada a não consumir ovos. Também é bom lembrar que o colesterol sangüíneo é somente parcialmente ligado ao colesterol da alimentação. A maior parte do colesterol sangüíneo humano é sintetizada no organismo a partir de grupamentos acetatos provenientes do metabolismo de glicídios e lipídios (Horn, 1977).

Os ovos, portanto, são alimentos altamente versáteis e contêm muitos nutrientes essenciais. Os ovos, como as sementes, foram criados para dar suporte à vida durante o crescimento embrionário. Por sua fácil digestibilidade e devido às muitas maneiras de prepará-los, podem servir de alimento para crianças, adultos, anciãos e convalescentes (Stadelman et al., 1988).

2.2 Proteínas

A proteína do ovo de galinha é usualmente utilizada como padrão, na medida da qualidade nutricional de outras proteínas, principalmente no que se refere ao seu perfil aminoacídico. A composição de aminoácidos dos ovos é notável a tal ponto que os nutricionistas do mundo inteiro consideram as proteínas do ovo inteiro (clara + gema) como proteínas de referência e a sua composição de aminoácidos essenciais não apresenta fator limitante algum, onde se destacam os aminoácidos lisina e metionina (Thapon, 1981; Croguennec, 2000).

Algumas frações protéicas apresentam potencialidades para novas classes de fármacos (Stadelman, 1999).

Dentre as proteínas da clara, algumas são enzimas e outras servem apenas como nutriente. O número total é desconhecido. Sabe-se que são mais de 40. As mais importantes têm sido estudadas com grande detalhe. A maioria destas proteínas é hidrossolúvel, com exceção da ovomucina, que tem a especial função de manter a estrutura de gel da mesma (Stevens, 1991).

A ovoalbumina é a mais abundante das proteínas da clara (Stevens, 1991). É uma glicoproteína (Croguennec et al., 2000). Não possui função biológica. Possui propriedades espumantes e gelificantes, imunológicas, alergênicas e nutritivas (Awandé et al., 1994).

A ovotransferrina também é conhecida como conalbumina e constitui 13% das proteínas da clara. Desempenha duas funções: transporte de ferro para os sítios de estocagem e utilização e defesa do embrião contra infecções bacterianas (Awandé et al., 1994; Croguennec et al., 1999). Também, é uma glicoproteína (Al-Mashikhi e Nakai, 1987). Esta proteína inibe o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Croguennec et al., 1999). Baron et al. (1997) observaram que a ovotransferrina também inibe o crescimento de *Salmonella enteritidis*, pois deixa o ferro indisponível, que é essencial para o crescimento microbiano.

A ovomucina corresponde a 1,5% da clara e tem alta viscosidade (Stevens, 1991; Awandé et al., 1994). A ovomucina é rica em ácido siálico (Thapon, 1981; Kato et al., 1987; Croguennec, 2000). A ovomucóide, ovoinibidor, cistatina e ovostatina desempenham um papel contra as proteinases bacterianas. A avidina é a mais estudada das proteínas ligadas a vitaminas, por ser a causadora da síndrome em humanos provocada pela ingestão de clara crua (Stevens, 1991).

Dentre as ovoglobulinas destaca-se a G1 conhecida como lisozima. O papel desta proteína é a proteção do embrião contra a invasão bacteriana. A G2 e a G3 não têm atividade catalítica (Stevens, 1991). Encontra-se lisozima na clara e na membrana vitelínica (De Boeck e Stockx, 1986). A lisozima EC 3.2.1.17 (mucopéptido N-acetil muramoilhidrolase) é uma enzima que tem a habilidade de destruir as bactérias, pois hidrolisa a β -ligação entre o ácido murâmico e a N-acetilglucosamina dos

mucopolissacarídeos das paredes celulares das bactérias. A lisozima também tem a propriedade de inativar certos vírus, pois forma complexos insolúveis com ácidos orgânicos (Thapon, 1981; Li-Chan et al., 1986). Possui potencial clínico para o tratamento de úlceras, infecções, e é um potencializador de antibióticos para uso humano (Li-Chan et al., 1986). Sua ação nos ovos embrionados não é bem esclarecida, servindo, provavelmente, como um mecanismo de defesa, até que o embrião tenha a capacidade de produzir as imunoglobulinas (7 dias antes da eclosão) (Kijowski et al., 1999). A lisozima apresenta interesse farmacêutico em razão de sua atividade lítica contra certos microrganismos (Guerin, 1991). A lisozima é a única proteína do ovo extraída em escala industrial. Os métodos de extração utilizados são: precipitação em presença de NaCl, cromatografia de troca iônica, cromatografia de afinidade ou ultrafiltração (Croguennec, 2000).

Na gema não são encontradas proteínas com atividades ou funções bioquímicas, com exceção da fosfotina que é rica em fósforo. A fosfotina tem uma ação antitrombina (Abe et al., 1982). A gema é um alimento rico para o embrião, pois é uma emulsão espessa com alta concentração de lipídios e lipoproteínas. A vitelogenina é a maior proteína da gema, fonte nutricional do embrião. A fosfotina é um quelante efetivo de íons metálicos, portanto, um potencial antioxidante (Kuksis, 1992).

2.3 Ácidos graxos ω -3 e ω -6

Os ácidos graxos das séries ω -3 e ω -6 são conhecidos por serem nutrientes essenciais para a dieta humana (Ferrier et al., 1995). Possuem uma longa cadeia hidrocarbonada polinsaturada e um grupamento carboxila terminal. O primeiro ponto de insaturação em um ácido ω -3 ocorre após o terceiro carbono, a partir da extremidade metila da cadeira carbônica e em um ácido ω -6, ocorre após o sexto carbono (Ewin, 1997). Eles são componentes estruturais das membranas fosfolipídicas de tecidos humanos como retina, cérebro e espermatozóides, nos quais o ácido docosahexaenóico (DHA) constitui mais de 36,4% do total dos ácidos graxos (Connor, 2000).

Os fosfolipídios do cérebro e da retina da maioria dos vertebrados caracterizam-se pelos altos conteúdos de ácidos graxos ω -3, principalmente o DHA (Lin et al., 1991;

Cherian e Sim, 1992, 1993; Maldjian et al., 1993, 1995; Farkas et al., 1996b; Speake et al., 1996; Becker e Kyle, 1998; Connor, 2000).

Os tecidos dos mamíferos necessitam de ácidos polinsaturados, como o araquidônico e o DHA, para o crescimento e a manutenção de membranas. Quando a dieta é deficiente desses ácidos, o organismo tenta compensar pela biossíntese através do ácido 5,8,11-eicosatrienóico da família ω -9 (Lin et al., 1991).

Um suprimento adequado de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa é essencial para a maturação de tecidos durante o período de desenvolvimento embrionário e neonatal (Maldjian et al. 1993, 1995; Farkas et al., 1996b; Speake et al., 1996; Cherian et al., 1997). Lin et al. (1991) recomendam a inclusão de ω -6 e ω -3 em fórmulas destinadas às crianças. Deficiências de DHA, durante o período de desenvolvimento da criança, são associadas ao enfraquecimento da acuidade visual e diminuição da performance intelectual (Maldjian et al., 1995; Speake et al., 1996). Os casos mais comuns desta deficiência ocorrem em crianças prematuras ou alimentadas com leite artificial no lugar do leite materno (Maldjian et al., 1995; Cherian et al. 1997). No leite de vaca somente são encontrados os ácidos linoléico e α -linolênico (α -LNA) (Connor, 2000). Recentemente, estudos mostraram que crianças alimentadas com fórmulas suplementadas com fosfolípidios de ovos, que são ricos em ácidos araquidônico e DHA, têm uma performance intelectual melhorada (Cherian et al., 1997).

Atualmente, a *Health and Welfare Canada* (1990) apud Ferrier et al. (1995) recomenda a ingestão diária de ácidos ω -3 para todas as idades, sendo 1,1g/dia para mulheres e 1,5 g/dia para homens de ácido α -LNA.

Também, há evidências epidemiológicas sugerindo que dietas contendo teores elevados de ácidos graxos ω -3 são associadas à redução do risco de doenças cardiovasculares, tais como doenças coronarianas, infarte do miocárdio e trombose. Estudos já demonstraram essas evidências em animais e em seres humanos. Há uma forte evidência de que existe uma relação inversa entre a quantidade de ácidos graxos ω -3 na dieta, sangue e tecidos e a ocorrência de doenças coronarianas e suas complicações (Ferrier et al., 1995).

Segundo Connor (2000) os ácidos graxos ω -3 atuam de diversas formas no organismo humano para prevenir as doenças cardíacas, tais como:

- agem na prevenção de arritmias (taquicardia ventricular e fibrilação);
- são precursores das prostaglandinas e leucotrienos;
- têm propriedades antiinflamatórias;
- são antitrombóticos;
- têm propriedades hipolipidêmicas com efeitos nos triacilgliceróis e lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDLs).

Stadelman (1999) confirma que pesquisadores identificaram o DHA como a substância responsável por uma redução significativa da agregação plaquetária, reduzindo problemas coronários de pacientes cardíacos.

O consumo de ovos enriquecidos com ácidos graxos ω -3 produz aumentos significativos nas concentrações do DHA e de outros ácidos graxos polinsaturados ω -3 na fração fosfolipídica do sangue humano (Ferrier et al., 1995). Assim, ovos enriquecidos com ácidos graxos ω -3 podem ser uma fonte natural de DHA, podendo ser úteis em fórmulas para alimentação infantil (Cherian e Sim, 1993).

Segundo Stadelman (1999), já existe um grande número de produtores no mundo oferecendo ovos como alimentos funcionais, pois são enriquecidos com ácidos graxos ω -3 e vitaminas, trazendo benefícios fisiológicos.

Dietas contendo altos teores do ácido α -linolênico (α -LNA) também têm sido associadas à redução de doenças cardiovasculares, possivelmente, através da sua conversão aos ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA), docosapentaenóico (DPA) e docosahexaenóico (DHA) (Cherian e Sim, 1992; Ferrier et al., 1995). O α -LNA pode ser metabolicamente convertido a DHA, entretanto, as enzimas envolvidas nesta conversão são comuns na seqüência para a elongação e desaturação do ácido linoléico, e a competição com ácidos ω -6 irá reduzir a quantidade de α -LNA convertido (Ferrier et al., 1995). O DHA, portanto, é pouco biossintetizado via elongação e desaturação de seu precursor essencial, o α -LNA (Becker e Kyle, 1998).

Os ácidos graxos ω -3 são convertidos no organismo em 3 prostanóides e 5 leucotrienos, enquanto os ω -6 produzem os 1 e 2 prostanóides e 4 leucotrienos, compostos denominados eicosanóides, que são críticos para a regulação fisiológica. A

competição pelas mesmas enzimas para a formação de eicosanóides, torna a razão entre o consumo de ω -6/ ω -3 muito importante para a manutenção da saúde (Jiang e Sim, 1993). A razão de ω -6/ ω -3, tem aumentado nas sociedades industrializadas em função do aumento do consumo de alimentos processados, ricos em ácidos graxos ω -6 e a redução do consumo de alimentos ricos em ω -3, como o peixe (Connor, 2000). A *Bristish Nutrition Fundation* estima que a razão da ingestão de ω -6/ ω -3 esteja entre 20 e 50:1, nos países industrializados, e recomenda uma diminuição nesta relação. A relação tolerada seria de 10:1, enquanto a ideal seria de 5:1 (Ferrier et al., 1995).

Ferrier et al. (1995) relatam, também, que há uma redução significativa da razão ω -6/ ω -3 após o consumo de ovos enriquecidos com ácidos graxos ω -3.

2.4 Ácido siálico

Ácido siálico é um termo genérico para aproximadamente 40 derivados do ácido neuramínico, o qual tem um grupamento acil no nitrogênio do grupo amino. O mais distribuído na natureza é o Neu5Ac (Inoue et al., 2000; Hartmann e Wilhelmson, 2001). O ácido N-acetilneuramínico (NANA) pertence à família dos açúcares aminados, contendo nove ou mais átomos de carbono ($C_{11}H_{19}NO_3$), de peso molecular 309,28 Da., com ampla distribuição no reino animal (Fukuda, 1994). Ele ocorre combinado com uma grande variedade de substâncias, incluindo mucoproteínas, mucolipídios, oligossacarídeos e nucleotídeos. A clara do ovo contém diferentes mucoproteínas; duas delas, a ovomucóide e a ovomucina, apresentam ácido siálico (Feeney et al., 1960).

Membros da família do ácido siálico ocorrem numa variedade de tecidos, fluidos orgânicos, bactérias (principalmente *Escherichia coli*) e incorporados a proteínas conjugadas (Fukuda, 1994).

Resultados de pesquisas têm demonstrado que o ácido siálico apresenta potencialidades de fornecer a base para uma nova classe de fármacos. Hartmann e Wilhelmson (2001) relatam que o vírus influenza (gripe), que é encontrado no trato respiratório de humanos, e o rotavírus são inibidos pelo ácido siálico. O rotavírus é o maior patógeno causador de gastroenterites em crianças, tanto em países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento (Stadelman, 1999).

O ovo é uma fonte natural de ácido siálico que está presente, principalmente, na gema, membrana da gema e chalaza (estrutura formada por clara modificada que sustenta a gema) (Seko et al., 1997; Hartmann e Wilhelmson, 2001). O ácido siálico e os sialoligossacarídeos são isolados de ovos, em escala comercial, no Japão (Stadelman, 1999).

2.5 Desenvolvimento do embrião de galinha

O desenvolvimento embrionário do *Gallus gallus domesticus* L. é bastante parecido com o dos demais vertebrados, e passa por uma série de fases situadas em duas etapas importantes, antes da postura, enquanto o ovo está no oviduto e depois da postura (Junqueira, 1978; Beig e Garcia, 1986).

2.5.1 Gametogênese

O óvulo ou oócito da galinha também é conhecido como ovo, e se caracteriza pela abundância de reserva nutritiva acumulada (vitelo ou gema), constituindo-se em um bom alimento para o homem e outros animais. É formado por três partes fundamentais: a gema, a clara e a casca. A gema é formada no ovário, enquanto que a clara e a casca são adicionadas ao redor da gema, durante o trânsito pelo oviduto (Beig e Garcia, 1986; Vieira et al., 1995a).

A maturação dos óvulos ou da gema ocorre seqüencialmente no pequeno ciclo, em intervalos de 26 horas, executada através de uma cadeia hierárquica de eventos da maturação dos folículos, na qual um grande número está sempre presente. Como resultado, um padrão constante de postura é estabelecido, onde uma enorme quantidade de lipídios é requerida para manter esta postura normal (Noble e Cocchi, 1990).

As lipoproteínas são as maiores fontes de nutrientes para o desenvolvimento de embriões das espécies ovíparas. São transportadas da circulação da galinha para a gema durante o crescimento dos oócitos. A APO II é a única lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL). A lipoproteína de alta densidade (HDL) é derivada do soro. As partículas de HDL são depositadas dentro da gema por um mecanismo que envolve a saída de outras lipoproteínas da gema (Vieira et al., 1995b).

Nas espécies ovíparas, a gema contém todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento do embrião. A maior parte dos componentes da gema é derivada de precursores plasmáticos, que são sintetizados no fígado e controlados pela taxa de estrogênio. Nas galinhas, os maiores precursores da gema são as lipoproteínas VLDL e a vitelogenina (VTG) (Vieira et al., 1995b). A função da HDL na gema oócito é desconhecida. Considerando-se que os ovários das aves não têm capacidade de sintetizar lipídios, a HDL da gema pode ser a fonte de fosfolipídios durante o crescimento dos oócitos nos primeiros estágios do desenvolvimento do embrião. Sua localização nos compartimentos da gema pode ser fagocitada pelas primeiras células embrionárias. A alta concentração de ésteres de colesterol sugere que os mesmos servem como blocos construtores das primeiras lipoproteínas, pelas enzimas do embrião, que esterificam o colesterol (Vieira et al., 1995b).

A composição de ácidos graxos e diferenças do teor de colesterol podem ser observadas em galinhas de diferentes espécies e linhagens. A variação da composição lipídica sofre influência da genética, da dieta e da idade da galinha (Noble, 1987; Noble e Cocchi, 1990).

2.5.2 Fecundação

A ovulação da galinha doméstica ocorre quase que diariamente, quando a gema que contém o óvulo ganha o ovário pela ruptura do folículo e entra no oviduto. A gema desce pelo oviduto pelos movimentos peristálticos. A fertilização ocorre na parte superior do oviduto, e a descida da gema no oviduto é caracterizada pela adição de proteínas do albúmen, membranas da casca e formação da casca para formar o ovo que vai ser posto (Speake et al., 1998).

Na fecundação, os gametas haplóides e de sexos diferentes se unem formando uma célula ovo diplóide. Os espermatozóides são depositados pelo galo na cloaca da galinha, atravessam todo o oviduto e se alojam na porção terminal ou infundíbulo. A gema, que contém o óvulo (oócito), passa a ser recoberta por um grande número de espermatozóides. Entretanto, somente um se associa ao núcleo do óvulo (oócito). A partir deste momento (\pm 24 horas antes da postura), a célula-ovo resultante da

fecundação, passa a ser diplóide e começa a se dividir (segmentar) por mitose (Beig e Garcia, 1986).

Dentro de um pequeno espaço de tempo, depois da ovulação e entrada no oviduto, o óvulo (oócito) encontra o espermatozóide, o qual subiu ao oviduto onde a fertilização ocorre. A divisão inicial do ovo fértil começa durante a descida do ovo pelo oviduto. Por causa da enorme massa da gema, a divisão celular ocorre somente na porção protoplasmática do ovo, onde o núcleo do zigoto está localizado (Speake et al., 1998).

A primeira segmentação ocorre 5 horas após a fecundação ao nível do istmo (porção do oviduto), onde também se forma a membrana da casca (Beig e Garcia, 1986).

A terceira segmentação ocorre 45 minutos mais tarde, a célula-ovo agora já tem 8 blastômeros (células) e chega ao útero. Devido à grande quantidade de material de reserva, esta formação de blastômeros acontece numa pequena porção circular da gema chamada de blastodisco. A partir deste estágio, podem ocorrer desigualdades de segmentação (Houillon, 1972).

Como as divisões celulares são sucessivas, o blastodisco vai se tornando cada vez maior, à medida que o ovo vai descendo pelo oviduto, mostrando uma organização celular característica. A parte central do mesmo corresponde à área pelúcida, sob a qual fica o blastoderma, isto é, uma cavidade (espaço entre a camada de células superficiais e a superfície do vitelo que está abaixo). A porção periférica corresponde à área opaca (Beig e Garcia, 1986).

A origem, a divisão e o desenvolvimento das principais células germinativas do embrião estão associados à área pelúcida e ao hipoblasto (Karagenc et al., 1996). Constatou-se que o aparecimento da área pelúcida coincide com a aquisição da simetria bilateral (\pm 7 horas antes da postura) (Houillon, 1972).

Pouco antes da postura, o blastoderma transforma-se, ao nível de área pelúcida, num germe diblástico, as células do blastodisco são gradativamente segregadas, a fim de constituírem os 3 folhetos originais do embrião, ou seja, o epiblasto (na superfície), o hipoblasto (em profundidade) e o mesoblasto (intermediário). Da organização e diferenciação destes folhetos acontecerá o desenvolvimento do embrião (Houillon, 1972).

Todos os nutrientes requeridos para a formação do embrião e crescimento do embrião, incluindo lipídios, proteína, vitaminas e elementos minerais, são pré-embalados no ovo no momento da postura. Durante os 21 dias de desenvolvimento e, principalmente, nos últimos 7 dias, é notável o metabolismo lipídico e o rápido crescimento embrionário. Aproximadamente 80% do conteúdo total de lipídios da gema é mobilizado e absorvido dentro dos tecidos embrionários durante este tempo (Noble e Cocchi, 1990; Speake et al., 1998).

Tanizaki et al. (1997) demonstraram que os glicopeptídeos sulfatados da ovomucina, membrana da gema e chalaza, podem estimular o sistema imunológico pela ativação dos macrófagos. No sistema imunológico, os macrófagos são importantes na fagocitose, na apresentação do antígeno, na citotoxicidade tumoral e na atividade antimicrobiana.

Um típico ovo de galinha pesa, aproximadamente, 60g e contém cerca de 20g de gema, a qual é 50% água e 50% matéria sólida. A gema contém, aproximadamente, 6g de lipídios e 3g de proteína (Speake et al., 1998). Cerca de 29% do peso total do ovo se constitui de gema, a qual contém quase a totalidade do conteúdo lipídico do ovo. Apenas uma pequena quantidade de lipídios é encontrada na cutícula da casca (Noble e Cocchi, 1990).

O ovo fértil pode ser dividido em quatro partes principais: a casca, as membranas da casca e câmara de ar, o albúmen (clara) e a gema, a qual está associada ao disco germinativo (Noble e Cocchi, 1990).

A temperatura, a umidade relativa e o ambiente gasoso interagem com o ovo fértil durante a estocagem, a ponto de afetar o sucesso da incubação. Como a composição da casca é relativamente fixa, ocorrem mudanças na composição das membranas da casca, cutícula, gema, próprio embrião e, principalmente, na clara durante a estocagem (Brake et al., 1997).

2.5.3 Desenvolvimento

Depois da postura, o ovo de galinha deve ser incubado para que o embrião prossiga no seu desenvolvimento. A incubação dura 21 dias, à temperatura de 37,5°C (Beig e Garcia, 1986).

A gastrulação começa durante as primeiras horas da incubação, caracterizando-se por um espessamento da região posterior da área pelúcida (Houillon, 1972).

Depois de 7 horas de incubação, o blastoderma perde sua forma circular e alonga-se ligeiramente. Após 12 horas de incubação, a região espessada está tipicamente alongada e representa o início da linha primitiva. A linha primitiva adquire sua forma e seu aspecto definitivo após 16 horas de incubação. Um sulco superficial aparece no espessamento, terminando em sua parte anterior por uma região mais compacta, o nó de Hensen. Após 18 horas de incubação, pode-se considerar que a gastrulação está terminada. Os três folhetos embrionários estão formados e a neurulação vai ter início (Dias, 1996).

Após 20 horas de incubação, aparece um espessamento superficial correspondente à placa neural, que se levanta numa dobra cefálica. O estágio de 24 horas de incubação marca uma etapa característica na organogênese. A dobra cefálica faz uma saliência nítida acima do blastoderma, e observam-se 4 pares de somitos mesodermais (Houillon, 1972).

O coração se diferencia entre 25 e 33 horas, sofrendo uma inflexão para o lado direito. A aparência simétrica do embrião desaparece após 33 horas de incubação (Dias, 1996).

Com 48 horas de incubação, o embrião apresenta 17 a 20 pares de somitos, botão caudal em início de formação, região cefálica contorcendo-se para a esquerda, vesícula óptica estrangida na base, esboço da flexura cranial, e presença das cinco vesículas cerebrais (Dias, 1996).

A diferenciação dos tecidos embrionários pode ser associada ao desenvolvimento de estruturas extra-embrionárias. A maior característica dos primeiros estágios do desenvolvimento do embrião é a formação de uma série de estruturas extra-embrionárias como as membranas amniótica, carioalantoínica e saco vitelínico (Speake et al., 1998).

A linha primitiva praticamente desaparece com 50 horas de incubação e tem-se o início da formação da membrana amniótica ou âmnio, cuja função é evitar a dessecação do embrião, já que os ovos são postos ao ar livre (Houillon, 1972).

Com 60 horas de incubação, forma-se a membrana carioalantoínica ou alantóide, cuja função principal é respiratória, também há o início da formação dos rudimentos de asa e de pata (Beig e Garcia, 1986). A membrana carioalantoínica é muito rica em capilares sangüíneos, que contornam a superfície das membranas da casca onde há a transferência de O₂ e CO₂ entre os poros da casca e o embrião. A segunda função desta membrana é a mobilização de Ca²⁺ da casca, para suprir as necessidades do embrião (Speake et al., 1998).

O saco vitelínico é também uma estrutura vascularizada que cresce exteriormente do embrião até envolver a gema inteira. Durante a primeira semana de desenvolvimento, o embrião bóia na superfície da gema, enquanto o saco cresce progressivamente exteriormente ao embrião até envolver completamente o conteúdo da gema. O maior papel deste saco é reter e fornecer lipídios e outros constituintes da gema, transferindo-os para a circulação do embrião. Convém ressaltar que aproximadamente a metade do conteúdo da gema é removida entre 13 a 17 dias de incubação do embrião (Speake et al., 1998).

Inicialmente, a gema é limitada pela membrana vitelínica que é dividida em 4 camadas distintas: 2 camadas interiores (a verdadeira e a membrana perivitelínica) formadas durante a maturação do folículo; 2 camadas externas (a contínua e a membrana extra-vitelínica) formadas durante a passagem do óvulo pelo oviduto. No início da incubação, há a dissolução destas membranas, que é o rápido desenvolvimento do saco vitelínico. Este saco é dividido em duas áreas estruturais: uma externa mesodérmica, formada por células lisas que têm a função de membrana de suporte, e a camada interna endodérmica consistindo de uma simples coluna de células contendo uma fila de componentes, através dos quais ocorre a absorção da gema (Noble e Cocchi, 1990). A membrana vitelínica tem espessura de 10mm e é composta por 3 camadas: externa, contínua e interna (Mineki e Koboyashi, 1997).

O desenvolvimento do saco vitelínico é extremamente rápido e no 5^o dia de incubação ele cobre toda a gema. Aproximadamente no 4^o dia de incubação ocorre a formação de dobras e microvilosidades na superfície interna deste saco. Ao mesmo tempo, o saco vitelínico sofre uma extensiva vascularização através do desenvolvimento de uma rede de capilares; o sangue flui por esses capilares e passa

por dentro do sistema porta do embrião via veias vitelinas. Não há evidências de qualquer sistema linfático dentro do saco vitelínico. Apesar da variabilidade de funções do saco vitelínico, há pouca variação morfológica. Embora esta estrutura seja contínua com as células endodérmicas no meio, a passagem de qualquer material da gema para dentro do intestino durante a incubação é prevenida durante o tempo anterior à eclosão (Noble e Cocchi, 1990).

Com 96 horas (4 dias) de incubação, o embrião apresenta os somitos atingindo a extremidade da cauda, botão caudal curvado para a região sacral, rotação completa do corpo, alantóide de tamanho aproximado ao da cabeça, vesícula óptica com pigmentação evidente e flexura troncal correspondendo a uma ampla linha curva (Dias, 1996).

Com 5 dias de incubação, há o início da formação dos órgãos reprodutores e diferenciação do sexo, e início da transformação de cartilagem em osso. (Beig e Garcia, 1986).

A formação das penas se inicia com 8 dias de incubação, e, aos 13 dias, aparecem as escamas e as unhas nas patas. No 14^o dia, o embrião altera sua posição, com relação ao eixo longitudinal do ovo, sendo que a cabeça fica voltada para a câmara de ar (Beig e Garcia, 1986).

Aos 18 dias há redução do líquido amniótico e o saco vitelínico entra gradativamente no corpo do embrião (Beig e Gracia, 1986).

No 20^o dia, o bico rompe a membrana da câmara de ar. Os pulmões começam a funcionar. O embrião ocupa praticamente todo o espaço disponível do ovo. Com 21 dias de incubação, tem-se o rompimento da casca e a eclosão do pinto (Beig e Garcia, 1986).

2.5.4 Eclosão

O processo de eclosão é caracterizado por uma seqüência de adaptações comportamentais, bioquímicas e fisiológicas, as quais são completadas em uma seqüência definida durante o período perinatal. É sugerido que o glicerol que sobrou da β -oxidação representa o maior substrato de gliconeogênese para o embrião (Speake et al., 1998).

No 19^o dia de incubação, o saco vitelínico é englobado progressivamente para dentro das cavidades corporais do embrião. Como resultado deste processo, o pinto recém-eclodido recebe 5g de gema residual contendo cerca de 1g de lipídios; esta gema servirá como uma fonte de nutrientes para muitos dias (Speake et al., 1998).

Apesar da extensiva absorção de lipídios da gema durante a última semana de incubação, uma apreciável quantidade permanece ainda sem absorção para o momento da eclosão. As 5g da gema residual contêm 1-2 g de lipídios remanescentes. Em termos de percentagem, isto representa cerca de ¼ dos lipídios originalmente presentes na gema (Noble e Cocchi, 1990).

Após a eclosão, há uma diminuição rápida do material residual da gema na cavidade abdominal do pinto, de sorte que, no 5^o dia após a mesma, somente vestígios permanecem (Noble e Cocchi, 1990).

Muitas sugestões têm sido postuladas a respeito da seqüência de eventos envolvendo a assimilação dos lipídios remanescentes pelo pinto, onde ocorrem mudanças significativas na composição e metabolismo desses lipídios pelo plasma, fígado e outros tecidos. Os altos níveis de ésteres de colesterol presentes nos momentos antecedentes ao descasque são rapidamente modificados a triglicerídeos e fosfolipídios (Noble e Cocchi, 1990).

Há um rápido estabelecimento da lipogênese indicando uma alteração imediata sobre o papel do fígado no metabolismo dos lipídios. Imediatamente após a eclosão, os tecidos do embrião adquirem uma extensiva capacidade de sintetizar seus próprios lipídios para fins estruturais e de reserva (Noble e Cocchi, 1990).

2.6 Importância dos lipídios no desenvolvimento do embrião

A nutrição do embrião, durante os primeiros estágios de desenvolvimento, ainda é pouco conhecida, porém, sabe-se que a glicose e alguns aminoácidos formados são a principal fonte de energia deste período (Speake et al., 1993, 1998). Farkas et al. (1996b) mencionam que neste período, quase não acontecem mudanças lipídicas e que somente uma pequena proporção da quantidade inicial dos lipídios da gema é utilizada nos 12 primeiros dias de incubação (aproximadamente 9%).

Entretanto, durante a segunda parte do desenvolvimento, isto é, após o 12^o dia de incubação, a qual representa o maior período de crescimento, a energia metabólica do embrião provém da utilização dos lipídios da gema (Cherian e Sim, 1993; Kanai et al., 1996; Cherian et al., 1997; Speake et al., 1998). Neste período, a metade dos ácidos graxos é transferida do complexo da gema/ saco vitelínico para o embrião. Porém, a maior transferência acontece no final do período embrionário, particularmente na última semana (Noble e Cocchi, 1990; Speake et al., 1993; Maldjian et al., 1995; Farkas et al., 1996b).

A absorção rápida dos lipídios da gema, durante a última semana de incubação está associada ao acúmulo de lipídios dentro dos tecidos embrionários. O catabolismo de lipídios, porém, está associado ao processo de incubação. Estudos já demonstraram que a composição de lipídios/ ácidos graxos do embrião é totalmente diferente da gema original da qual o embrião é derivado (Speake et al., 1998).

A transferência de lipídios da gema para o embrião foi caracterizada pelas descobertas destas altas taxas de colesterol esterificado presentes no fígado do embrião. (Kanai et al., 1996). A proporção de colesterol livre da gema é rapidamente esterificada, principalmente, para éster de colesteril (oleato de colesteril) no saco vitelínico. Posteriormente, estudos com grande interesse foram realizados em ácidos graxos de cadeia longa polinsaturados (Speake et al., 1998). Portanto, é possível determinar a rede de transferência de ácidos graxos ω -3 e ω -6 da gema para o embrião e quantificar as mudanças na composição lipídica (Cherian e Sim, 1993).

2.6.1 Transferência dos ácidos graxos

Os lipídios da gema são fontes nutritivas primárias que garantem a embriogênese e a sobrevivência do embrião em um sistema fechado, pré-embalado, que é o ovo (Maldjian et al., 1995).

As taxas de transferência dos ácidos palmítico, oléico, linoléico, linolênico e araquidônico do complexo lipídico da gema, são praticamente as mesmas. O ácido docosahexaenóico (DHA) é transferido em proporções significativamente muito mais altas, principalmente durante o início da última semana da embriogênese (Maldjian et al., 1995).

A liberação do DHA é devida à ação da enzima lipoproteína lipase do plasma do embrião (Cherian et al., 1997). O DHA é acumulado nos lipídios do embrião entre o 13^o e o 16^o dia de incubação; sua taxa é alta, quando comparado aos outros ácidos (Maldjian et al., 1995). Oitenta por cento das taxas de C₁₆ e C₁₈, que são transferidos no início da incubação e no primeiro dia após a eclosão, são oxidados para produção de energia via β -oxidação. (Maldjian et al., 1995).

Durante a 3^a semana de incubação, há um rápido crescimento embrionário e uma intensa transferência de lipídios da gema, resultando no aumento de ácidos graxos ω -3 e ω -6 nos tecidos embrionários (Cherian et al., 1997).

Um processo complementar de saída de lipídios da gema, com a utilização dos mesmos pelos tecidos embrionários, é intenso durante a última fase do desenvolvimento embrionário, essencial para o sucesso da eclosão e sobrevivência do pinto (Speake et al., 1993).

2.6.2 Transformações bioquímicas no saco vitelínico

Os estágios iniciais da transferência dos lipídios da gema para os tecidos do embrião são mediados por uma estrutura extra-embriônica chamada de saco vitelínico, que envolve a gema, e que é funcionalmente conectado ao corpo do embrião por um extenso sistema vascular (Speake et al., 1993; Shand et al., 1994). Esta estrutura se estende pela parte de fora do embrião até circundar toda a gema no 5^o dia de desenvolvimento (Speake et al., 1993; Cherian et al., 1997).

Na membrana desta estrutura, os lipídios são reunidos em partículas lipoprotéicas, as quais são lançadas na rede de capilares adjacentes para a entrega na circulação do embrião (Madjian et al., 1993; Shand et al., 1994; Farkas et al., 1996a; Speake et al., 1998).

Segundo Speake et al. (1998), o saco vitelínico tem um papel fundamental na utilização dos lipídios, pelo embrião de galinha e sua função pode ser dividida em 3 partes: fornecer lipídios da gema; remodelar estruturas lipídicas, particularmente com relação aos conteúdos de ácido araquidônico e docosahexaenóico (DHA); reunir os lipídios modificados em lipoproteínas para serem secretados na circulação embrionária.

O sistema enzimático $\delta 6$ -desaturase presente no saco vitelínico converte o ácido esteárico em ácido oléico. Este ácido tem a função metabólica na esterificação do colesterol livre para a forma de oleato de colesteril (Speake et al., 1993, 1998).

A hidrólise e a re-esterificação derivada de fosfolipídios dentro do saco vitelínico, ainda não foram estudadas (Speake et al., 1998). Também, a origem do DHA e de outros ácidos polinsaturados de cadeia longa no desenvolvimento do embrião ainda não foi bem elucidada. Sabe-se, porém, que o aumento destes ácidos no tecido embrionário é dependente do fornecimento dos ácidos precursores com 18 carbonos provenientes da gema (Cherian et al., 1997). Recentemente, foram identificadas como atividades de desaturação a conversão de ácido linoléico a ácido araquidônico pelo sistema enzimático $\delta 6$ -desaturase (Cherian e Sim, 1993; Maldjian et al., 1995; Speake et al., 1998). Embora a síntese de DHA via $\delta 6$ -desaturase já tenha sido demonstrada no embrião de galinha, este processo é limitado, pois a quantidade do substrato, o ácido linolênico, disponível na gema, é muito pequena (Maldjian et al., 1995).

2.6.3 Lipídios plasmáticos

A absorção de lipídios está associada ao aumento de seus níveis dentro do plasma do embrião. Entre o 13^o e o 18^o dias de incubação, a concentração lipídica plasmática aumenta continuamente até uma pequena queda que ocorre justamente antes da eclosão (Noble e Cocchi, 1990; Maldjian et al., 1995).

A fração triglicéridica é a maior fração lipídica do plasma entre o 12^o e o 14^o dias, e diminui drasticamente no 19^o dia (Maldjian et al., 1995). Esta fração contém altas proporções de ácido docosahexaenóico (DHA) (aproximadamente 14% p/p) e baixas proporções de ácido araquidônico (aproximadamente 3% p/p); a fração fosfolipídica é rica em ácido araquidônico (aproximadamente 18% p/p) e contém baixas proporções de DHA (menos de 3%p/p) (Maldjian et al., 1993, 1995).

A finalidade da transferência do DHA dos fosfolipídios da gema para a forma de triglicérides plasmáticos é para facilitar a saída deste ácido durante a ação da lipoproteína lipase (LPL) nas lipoproteínas plasmáticas, desde que os triglicérides sejam os substratos preferidos desta enzima. Também há o propósito de translocação

do DHA entre as classes lipídicas, necessária para a entrega deste ácido no cérebro. (Maldjian et al., 1993).

2.6.4 Enzima lipoproteína lipase

A enzima lipoproteína lipase (LPL) pode ser considerada como um regulador primário da distribuição dos lipídios derivados da gema. A concentração desta enzima está relacionada à distribuição dos lipídios entre as organelas do embrião, com repercussões no metabolismo e na composição dos tecidos (Speake et al., 1998). Níveis relativamente altos de ácido docosahexaenóico (DHA) estão presentes nas frações triglicéridicas isoladas do plasma, tecido adiposo, coração e fígado. Uma proporção relativa deste ácido graxo na fração triacilglicerol pode ser explicada em termos de substrato específico desta enzima (Speake et al., 1993).

A lipoproteína lipase está presente em altas concentrações no tecido adiposo e coração do embrião de galinha com 14 dias de desenvolvimento. A enzima também está presente no músculo esquelético, porém, em menor quantidade e ausente no cérebro e fígado (Speake et al., 1993). O fato de que a lipoproteína lipase não é expressa no cérebro do embrião de galinha sugere a possibilidade de uma saída direta de ácidos graxos hidrolisados pela lipoproteína lipase plasmática nestes tecidos. O DHA pode ser preferencialmente mobilizado do tecido adiposo para ser entregue ao cérebro na forma não esterificada pelo plasma (Farkas et al., 1996b).

A lipoproteína lipase pode estar envolvida na utilização de lipídios derivados da gema pelos tecidos do embrião (Maldjian et al., 1993; Speake et al., 1993).

2.6.5 Tecido adiposo subcutâneo

O tecido adiposo subcutâneo do embrião é identificado no 12^o dia, coincidindo com o início da utilização dos lipídios da gema (Speake et al., 1993, 1998; Farkas et al. 1996b). Este tecido tende a crescer rapidamente durante a última semana da embriogênese, e serve como mediador na transferência de ácido docosahexaenóico (DHA) da gema para o cérebro (Farkas et al. 1996a; Speake et al., 1998).

A quantidade de DHA nos triglicérides no depósito adiposo (definidos como colchões laterais subcutâneos em ambos os lados do embrião), aumenta até o valor de

aproximadamente 17,1 μ mol/ depósito no 20^o dia. Entretanto, após a eclosão, a quantidade de DHA no tecido adiposo diminui significativamente, refletindo a mobilização de triglicerídeos para fornecer energia para o processo de eclosão e para a adaptação ao período neonatal (Maldjian et al., 1993).

2.6.6 Órgãos embrionários

Aparentemente, o fígado do embrião das aves parece ser quase que um receptáculo inerte para os resíduos dos processos de transferência de lipídios, porém, há a possibilidade de que este tenha a capacidade de reunir estes resíduos de lipídios em lipoproteínas para relançá-las para a circulação (Speake et al., 1998).

Uma expressiva atividade da enzima colesterol aciltransferase (ACAT) é encontrada na segunda metade do período de desenvolvimento; esta atividade é máxima no período onde a transferência de lipídios da gema é mais intensa. O papel da ACAT no fígado do embrião é catalisar a reação que fornece o oleato de colesterol, que compreende de 70-80% dos ésteres de colesterol formados. Convém salientar que o triacilglicerol plasmático contém altos níveis de ácido docosahexaenóico (DHA), entre os dias 12 e 15 de desenvolvimento. É notável que a composição de ácidos graxos da fração ésteres de colesterol, depositada no fígado, reflete a respectiva encontrada nos lipídios plasmáticos. Assim, no 12^o dia, quase que 80% dos ésteres de colesterol do fígado são oleatos de colesterol, enquanto que a proporção de DHA é aproximadamente 20% p/p do total de ácidos graxos (Shand et al., 1994). Os triglicerídeos encontrados no fígado do embrião, durante a incubação, têm alta concentração de ácido DHA (Noble e Cocchi, 1990).

A maior fração lipídica do coração e dos músculos esqueléticos do embrião é formada por fosfolipídios e colesterol livre. Fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina com altos teores de ácidos graxos polinsaturados araquidônico e DHA são os maiores componentes da fração fosfolipídica (Noble e Cocchi, 1990).

Como nos mamíferos, os pulmões do embrião são ricos em fosfolipídios (Noble e Cocchi, 1990).

O desenvolvimento funcional dos olhos e cérebro, em comum com outros tecidos nervosos, requer lipídios e ácidos graxos específicos. Durante o processo de

incubação, há um acúmulo de colesterol livre acompanhado pela concentração de altos níveis de ácidos graxos polinsaturados ambos, com séries ω -3 e ω -6 (Noble e Cocchi, 1990).

O DHA é acumulado nos tecidos do sistema nervosos durante a fase de rápido crescimento do cérebro. Similarmente, é essencial para a maturação funcional da retina. Quase todo o DHA presente na gema inicial será destinado aos fosfolipídios do cérebro e da retina. Entretanto, este ácido é primeiramente transferido do complexo da gema na forma de triglicerídeos. A maior consequência da presença do DHA na forma de triacilglicerol é facilitar a ação da enzima lipoproteína lipase presente nas lipoproteínas plasmáticas, uma vez que o triacilglicerol é o substrato preferencial desta enzima. Altas atividades desta enzima são encontradas nos tecidos adiposos do embrião de galinha. Esta enzima não é detectável no cérebro, em nenhum estágio do desenvolvimento embrionário, e nem no período pós eclosão. A maior função desta enzima é fornecer ácidos graxos livres aos tecidos diretamente adjacentes aos capilares onde esta enzima está localizada (Maldjian et al., 1996).

3 OBJETIVOS

- Verificar a qualidade sanitária dos ovos embrionados produzidos, através de análises microbiológicas.
- Avaliar a atividade antimicrobiana para o controle e a inativação de *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus*.
- Quantificar os aminoácidos totais através do auxílio de um analisador de aminoácidos.
- Traçar o perfil protéico através das técnicas de CLAE-fase reversa, eletroforese SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio) e eletroforese de focalização isoeletrica.
- Quantificar os níveis de ácidos graxos ω -6 e ω -3, em especial o ácido docosahexaenóico (DHA), por cromatografia gasosa.
- Determinar o teor de potássio, sódio, magnésio e cálcio por espectrofotometria de absorção atômica de chama.
- Determinar os teores de ácido siálico através de espectrofotometria UV-VISÍVEL.

4 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

4.1 Obtenção dos ovos embrionados

Os ovos embrionados de *Gallus gallus domesticus* L. foram obtidos no aviário do Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da UFSC. Para isso, foram utilizados os ovos férteis de 24 galinhas poedeiras comerciais da linhagem *Isa Brown*, dispostas em 6 gaiolas móveis de 2m², com 4 fêmeas e 1 macho em cada uma (Figura 3).



Figura 3: Gaiola móvel com galinhas poedeiras da linhagem *Isa Brown* do Departamento de Zootecnia – CCA/UFSC - 2000.

As aves foram criadas em sistemas intensivos de criação ao ar livre, segundo Salatin (1993). Neste sistema, as aves são colocadas no pasto a partir do 40^o dia de vida, em gaiolas móveis. As gaiolas dispõem de abrigo, poleiros, bebedouros, comedouros e ninho. As gaiolas são transferidas de posição, à medida que o pasto é consumido, observando-se o tempo de repouso e o período de ocupação em função do consumo de pasto.

A poedeira *Isa Brown* foi selecionada pelo seu comportamento, por ser uma ave que se adapta bem a este sistema intensivo e porque produz ovos de casca marrom com qualidade externa, tamanho e peso mais uniformes (Newsletter, 2001).

A alimentação, constituída de ração balanceada comercial (Purina®)¹, foi distribuída *ad libitum* nas primeiras horas da manhã (Figura 4).



Figura 4: Alimentação das galinhas poedeiras da linhagem *Isa Brown* do Departamento de Zootecnia – CCA/UFSC - 2000.

1 – Ração para aves de criação caseira: umidade (max) 13,0%, proteína bruta (min) 14,0%, extrato etéreo (min) 2%, matéria fibrosa (max) 11%, matéria mineral (max 18%), cálcio (max) 4,0% e fósforo (min) 0,4% (Purina, 2000).

A coleta de ovos foi realizada quatro vezes ao dia observando as condições sanitárias (Figura 5).



Figura 5: Coleta de ovos férteis de galinhas poedeiras da linhagem *Isa Brown* do Departamento de Zootecnia – CCA/UFSC - 2000.

Os ovos férteis obtidos foram escolhidos segundo critérios de integridade da casca, homogeneidade de cor, forma e dimensões, datados, enumerados, pesados e estocados a um intervalo de temperatura entre 10 a 20°C, por um período não superior a 3 dias.

Foram incubados 90 ovos de cada vez, a uma temperatura de $39,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, com uma umidade relativa de cerca de 85%, com auxílio de uma incubadeira Mibo (Petersime, Brasil). Foram utilizados ovos com 0, 3, 5, 7, 9 e 11 dias de incubação. O período de incubação seguiu o delineamento estatístico para análise de regressão segundo Montgomery (1997). A casualidade da escolha dos ovos foi garantida pela tabela de números aleatórios (Vieira e Hoffmann, 1989, p.154). No dia da escolha, sorteavam-se os 15 ovos enumerados que foram retirados nos dias de incubação correspondentes (Figura 6).



Figura 6: Incubação dos ovos férteis de galinhas poedeiras da linhagem *Isa Brown* do Departamento de Zootecnia – CCA/UFSC - 2000.

4.2 Liofilização

Os ovos, anteriormente sorteados e incubados, foram abertos assepticamente em placas estéreis para a verificação do estágio embrionário. Em seguida, fez-se a homogeneização e o congelamento do conteúdo com o auxílio de um homogeneizador BagMixer (Interscience, França) e de um congelador de placas (-40°C por 24 horas) (Frigostrella, Brasil).

Após o congelamento, o material foi submetido ao processo de liofilização para sua conservação, utilizando um liofilizador de bancada (Edwards, E-C Micromodulyo Freeze Dryer, EUA) e uma bomba de vácuo (Savant, EUA).

Finalmente, o material foi acondicionado de forma a assegurar total garantia de inviolabilidade, conservação e integridade. Para isso, o material liofilizado foi colocado em frascos estéreis de plástico com tampa (Falcon[®]), com capacidade para 30 g, os quais foram fechados hermeticamente, denominando-se cada um deles, uma unidade amostral (Figura 7).



Figura 7: Unidades amostrais (30g) de ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação.

5 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA: Atividade de inibição ao crescimento de *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus*

Um dos objetivos do trabalho foi o de verificar a qualidade sanitária dos ovos embrionados e liofilizados produzidos. Outro objetivo foi o de se avaliar as potencialidades destes ovos na inibição do crescimento microbiano. Para isso, selecionou-se um microrganismo Gram- (*Salmonella enteritidis*) e outro Gram+ (*Staphylococcus aureus*), para verificação destas hipóteses, os quais podiam ser manipulados nas condições de segurança laboratorial disponíveis.

Com os resultados obtidos, foi elaborado o seguintes artigo: **Inhibition activity in growth of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in freeze-dried chicken embryo eggs with different days of development** enviado para publicação no **Brazilian Archives of Biology and Technology** (ISSN 1516 - 8913) (Anexo 2, p. 87). O resumo, a metodologia, os resultados e a discussão são apresentados a seguir:

5.1 Resumo

Estes artigos relatam o potencial de crescimento de *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus* em ovos de galinha embrionados e liofilizados. Verificou-se que os mesmos não apresentaram mecanismos de resistência ao crescimento de salmonela nem de estafilococos.

Palavras-chave: *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, ovos embrionados, mecanismos de resistência.

5.2 Metodologia

Os exames microbiológicos para *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus*, realizados nos ovos de galinha embrionados e liofilizados, foram baseados na metodologia empregada por Baron et al. (1997), descrita a seguir:

5.2.1 Preparo das unidades amostrais

Primeiramente, os ovos de galinha embrionados e liofilizados foram reconstituídos para se fazer os ensaios, levando-se em conta que o extrato seco dos mesmos é de

aproximadamente 24%. Foram preparadas 4 alíquotas de 5 mL de unidades amostrais, de cada dia de incubação.

A casualidade para a escolha das unidades amostrais foi garantida pelo uso da tabela de números aleatórios (Vieira e Hoffmann, 1989).

5.2.2 Teste de esterilidade das amostras

A esterilidade dos ovos de galinha embrionados e liofilizados foi testada da seguinte maneira: pela técnica de semeadura em profundidade (*pour plate*) 1 mL do ovo reconstituído, de cada dia de incubação, foi inoculado em ágar soja triptona (*TSA – tryptone soy agar*) (AES Company, Comburg, França) incubado a 37°C por 24h. Em seguida, procedeu-se à contagem de células viáveis presentes. Foram realizadas 4 repetições para cada teste.

5.2.3 Preparação dos inóculos

A cepa da *Salmonella enteritidis* (SF 9066.94), usada nesse estudo, foi obtida e identificada por Sylvine Fremy (Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires, Paris, França). A cepa foi mantida em *cryobille*, anel de cerâmica com solução criopreservativa (AES Company, Comburg, França) a -18°C e, posteriormente, descongelada e reativada em 9 mL de caldo de soja triptona (*TSB - tryptic soy broth*) (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) e incubada a 37°C por 24 h. A seguir, foram preparadas diluições decimais da cultura-estoque de 24 h até a obtenção de um inóculo de *S. enteritidis* com população aproximada de 10^7 UFC/ mL. Foi realizado o teste da taxa de inoculação.

A cepa da *Staphylococcus aureus* (Coq.1), usada neste estudo, foi obtida e identificada por Florence Baron (Laboratoire de Microbiologie, École Nationale Supérieure Agronomique, Rennes, França). A cepa foi mantida em *cryobille*, anel de cerâmica com solução criopreservativa (AES Company, Comburg, França) a -18°C e, posteriormente, descongelada e reativada em 9 mL de caldo de soja triptona (*TSB - tryptic soy broth*) (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) e incubada a 37°C por 24 h. A seguir, foram preparadas diluições decimais da cultura-estoque de 24 h até a obtenção

de um inóculo de *Staphylococcus aureus* com população aproximada de 10^5 UFC/ mL. Foi realizado o teste da taxa de inoculação.

5.2.4 Inoculação

Foram utilizados 0,1 mL dos inóculos preparados anteriormente em 4 alíquotas de 5 mL dos ovos reconstituídos do dia 0, 3, 5, 7, 9 e 11. Após a inoculação, os frascos foram incubados em banho-maria a 30°C por 48 horas.

5.2.5 Contagem de *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus*

Para proceder à contagem do número de células de *Salmonella enteritidis* presentes, foram realizadas diluições decimais até 10^{-7} dos tubos inoculados e incubados a 30°C por 48 horas. Em seguida, 1 mL do conteúdo de cada uma destas diluições foi inoculado em placas de ágar soja triptona, incubado a 37°C por 24h. Após a incubação, procedeu-se à contagem de células viáveis presentes.

Para proceder à contagem do número de células de *Staphylococcus aureus* presentes, foram realizadas diluições decimais até 10^{-5} dos tubos inoculados e incubados a 30°C por 48 horas. Em seguida, 1 mL do conteúdo de cada uma destas diluições foi inoculado em placas de ágar soja triptona, incubado a 37°C por 24h. Após a incubação procedeu-se à contagem de células viáveis presentes.

5.3 Resultados e discussão

Não foi observado crescimento das bactérias mesófilas, através da realização do teste de esterilidade das amostras, em quaisquer das alíquotas de 5 mL dos ovos reconstituídos, das unidades amostrais, dos dias 0, 3, 5, 7, 9 e 11 dias de desenvolvimento, após 24 horas de incubação a 37°C em TSA. Dessa forma, assegurando que nenhum microrganismo viável estava presente nas referidas unidades amostrais. Posteriormente, foi feito um estudo para avaliar a atividade antimicrobiana destes materiais, com relação aos microrganismos *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus*.

Como pode ser verificado na Figura 8, ovos de galinha embrionados e liofilizados não apresentaram mecanismos de resistência ao crescimento de salmonela, pois, em

relação ao inóculo inicial, os níveis de contaminação foram $> 10^7$ células de *Salmonella enteritidis* por mL das unidades amostrais, indicando um crescimento generalizado.

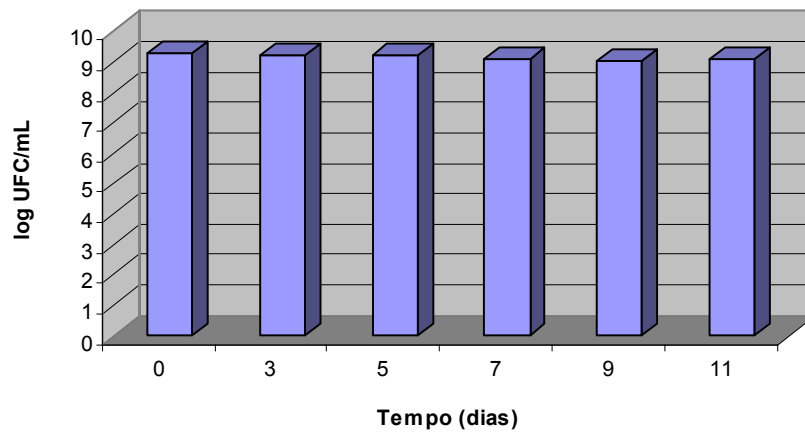


Figura 8: Crescimento de *Salmonella enteritidis* inoculada em ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de desenvolvimento em TSA, após 48 horas de incubação a 30°C. Inóculo inicial 10^7 UFC/mL.

Como pode ser verificado na Figura 9, ovos de galinha embrionados e liofilizados não apresentaram mecanismos de resistência ao crescimento de estafilococos, pois, em relação ao inóculo inicial, os níveis de contaminação foram $> 10^5$ células de *Staphylococcus aureus* por mL das unidades amostrais, também indicando um crescimento generalizado.

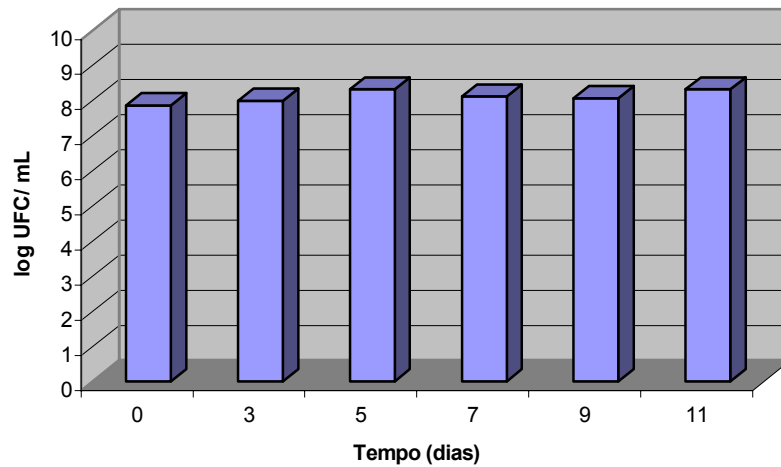


Figura 9: Crescimento de *Staphylococcus aureus* inoculado em ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de desenvolvimento em TSA, após 48 horas de incubação a 30°C. Inóculo inicial 10^5 UFC/mL.

Uma provável explicação para este fenômeno, é que a metodologia empregada não foi capaz de evidenciar a atividade antimicrobiana desses ovos, pois as enzimas lisozima e ovotransferrina, que são inibidores do crescimento microbiano, presentes na clara de ovos, podem não ter sido detectadas.

Este estudo permite concluir que a metodologia empregada para o preparo das unidades amostrais dos ovos de galinha embrionados e liofilizados, produzidos neste experimento, foi adequada do ponto de vista higiênico-sanitário.

6 AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

A avaliação físico-química visou à caracterização dos ovos embrionados. Para isso, foram determinados: os aminoácidos e o perfil protéico, o teor dos ácidos graxos ω -3 e ω -6, o teor dos elementos minerais potássio: sódio, magnésio e cálcio, e a quantidade de ácido siálico. Com os resultados obtidos, foram elaborados os seguintes artigos:

6.1 Determinação de aminoácidos e do perfil protéico

Determination of amino acids and protein profile in freeze-dried chicken embryo eggs with different days of development é o título do artigo submetido para publicação no **Brazilian Archives of Biology and Technology** (ISSN 1516 - 8913) (Anexo 3, p.93). O resumo, a metodologia, os resultados e a discussão são apresentados a seguir:

6.1.1 Resumo

Este artigo relata a composição dos aminoácidos obtida com o auxílio de um analisador de aminoácidos, e a caracterização protéica realizada através das técnicas de CLAE–fase reversa, eletroforese SDS-PAGE e eletroforese de focalização isoelétrica de ovos de galinha embrionados e liofilizados, com diferentes dias de incubação. Não foram verificadas diferenças na composição aminoacídica, com exceção do aminoácido prolina. O perfil protéico destes ovos não é igual, sendo que a diferença fica mais evidente a partir do 5^o dia de desenvolvimento onde há um aumento da concentração de substâncias biologicamente ativas (proteínas: ovalbumina, ovotransferrina, apoLDL, apoHDL e lisozima), e diminuição da concentração de outras substâncias (proteínas: ovomucina e ovostatina), por estarem associadas ao desenvolvimento de tecidos e órgãos embrionários.

Palavras-chave: ovos embrionados, aminoácidos, proteínas.

6.1.2 Metodologia

6.1.2.1 Composição de aminoácidos

A composição de aminoácidos totais foi determinada segundo a metodologia descrita por Spackman et al. (1958), utilizando o analisador Pharmacia-LKB (Alpha Plus, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Orsay, France).

A hidrólise ácida das unidades amostrais (2mg) foi realizada com HCl 6N por 24 horas a 110°C.

Para quantificar a cisteína e os resíduos de metionina, as unidades amostrais foram previamente oxidadas com ácido perfórmico e, então, hidrolisadas a 110°C com HCl 6N, de acordo com Moore (1963).

6.1.2.2 Perfil protéico obtido por CLAE – fase reversa

O perfil protéico dos ovos de galinha, embrionados e liofilizados com diferentes dias de desenvolvimento, foi determinado por CLAE–fase reversa, segundo a metodologia descrita por Nau et al. (1999).

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo Spectra-physics (Fremont, Califórnia, EUA), equipado com uma bomba inerte para gradientes binários, modelo Spectra SERIES P200, com válvula de injeção manual, injetor inerte de 200µL e um sistema de degaseificação a hélio. A coluna usada foi Vydac protein C4 (Touzart e Matignon, Les Ulis, França). A detecção foi realizada a 280nm com um detector de absorbância UV/Vis, modelo Spectra SERIES UV 100. Os cromatogramas foram processados com auxílio do programa AZUR versão 2.0 (1999-2001) para Windows.

Os reagentes utilizados foram: ácido trifluoracético (TFA) (Sigma, Steinheim, Alemanha); acetonitrila grau CLAE (ACN) (Carbo Erba Reagenti, Rodano, Itália); a água foi purificada pela filtração em sistema Milli-Q (Millipore, Molsheim, França).

As eluições foram realizadas em gradiente de concentração em água-acetonitrila contendo 0,025% TFA. As eluições com gradiente linear aumentam a concentração de 7% ACN para 70% ACN em 25 minutos em velocidade de fluxo 0,8 mL/min.

Preparo das unidades amostrais: as unidades amostrais dos ovos embrionados e liofilizados foram reidratadas com água purificada (0,08g do pó para 10 mL de água),

centrifugadas, e o sobrenadante foi filtrado em uma membrana de 0,20 μm antes da injeção no cromatógrafo.

A identificação das proteínas, através de CLAE–fase reversa, foi realizada pela comparação dos seus respectivos tempos de retenção com aqueles das proteínas provenientes da clara líquida, de um ovo não fecundado de galinha poedeira da linhagem *Isa Brown*, usada como padrão.

6.1.2.3 Perfil protéico obtido por eletroforese SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio)

A determinação do perfil protéico por eletroforese SDS-PAGE foi realizada segundo a metodologia descrita por Laemmli (1970), utilizando gel de poliacrilamida a 15% e 0,1% de SDS (dodecil sulfato de sódio). Foram utilizados 40 μL de solução das unidades amostrais de ovos embrionados com diferentes dias de incubação a concentração de proteína de 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. A eletroforese foi realizada em corrente constante (150 V) por 45 min em um tampão TRIS 25mM – glicina 190mM contendo 0,1% SDS – pH 8,3. O gel foi corado com soluções aquosas de azul de Coomassie a 0,5% ou nitrato de prata a 0,2%, segundo Tunon e Johansson (1984).

6.1.2.4 Perfil protéico obtido por eletroforese de focalização isoeétrica

A determinação do perfil protéico por eletroforese de focalização isoeétrica foi realizada segundo a metodologia descrita por Desert et al. (2001), utilizando o gel de poliacrilamida a 7,5% e anfólitos na faixa de pH 3-7.

Foram utilizados 5 μL e 10 μL de solução das unidades amostrais de ovos embrionados com diferentes dias de incubação, correspondendo a 10 e 20 μg de proteína, respectivamente.

A eletroforese foi realizada a 100V (amperagem 9mA) durante 1 hora, 250V (amperagem 20 mA) durante 2h e 30 minutos e a 500 V (amperagem 9 mA) durante 2h e 30 minutos.

Os tampões de migração foram cátodo: lisina 20 mM-arginina 20mM e ânodo: H_3PO_4 10mM.

Após a migração, o gel foi corado com solução aquosa de nitrato de prata a 0,2%.

6.1.3 Resultados e discussão

O perfil de aminoácidos dos ovos de galinha embrionados e liofilizados em diferentes dias de incubação está apresentado na Tabela 1. Verifica-se que não há diferenças significativas na composição dos aminoácidos com exceção da prolina.

Parkinson (1972) também verificou que a abundância relativa dos diferentes tipos de aminoácidos é similar para quase todos os tipos de proteínas do ovo.

Supõe-se que o aumento da prolina, a partir do 9^o dia de desenvolvimento, é devido ao fato de que este aminoácido está envolvido com a formação e crescimento de tecidos. A prolina é um dos constituintes do colágeno que contém 21% de prolina e hidroxiprolina. Também é preciso salientar que a prolina não é um aminoácido essencial e sua biossíntese se dá através da conversão do glutamato (Voet e Voet, 1995).

Tabela 1: Média da composição em aminoácidos (g/kg) em unidades amostrais de ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação.

AA/Dias	0	3	5	7	9	11
Ac. Aspártico	46,0	51,2	43,0	49,6	53,2	51,9
Treonina	21,7	24,6	22,2	26,2	24,7	22,4
Serina	32,5	34,8	31,2	34,2	36,6	33,5
Ac. Glutâmico	59,3	74,0	55,1	60,5	62,5	61,4
Prolina	12,6	9,4	8,0	9,9	15,8	19,1
Glicina	16,8	18,5	15,1	18,7	15,1	14,5
Alanina	26,0	29,2	23,5	24,9	23,1	24,6
Cisteína	10,9	11,9	11,3	14,9	12,8	13,8
Valina	26,8	30,8	29,0	31,4	24,5	25,3
Metionina	15,0	16,7	19,6	18,3	14,8	16,0
Isoleucina	21,1	23,8	19,0	24,4	21,2	19,5
Leucina	36,7	31,6	35,6	42,4	30,8	30,7
Tirosina	19,3	25,2	20,0	26,1	21,7	23,2
Fenilalanina	31,0	35,9	29,7	36,7	27,1	25,3
Histidina	11,1	11,8	9,0	9,5	11,2	11,4
Lisina	28,0	31,7	25,2	27,1	30,4	32,1
NH₃	7,0	7,2	5,8	6,0	6,6	6,3
Arginina	28,4	30,9	30,4	28,7	31,6	29,6

Evidencia-se que os ovos embrionados com diferentes dias de desenvolvimento demonstram ser fontes dos aminoácidos essenciais, treonina, valina, metionina, isoleucina, fenilalanina, histidina e da arginina, pois estes são necessários para o desenvolvimento normal do embrião.

As proteínas dos ovos embrionados foram separadas por CLAE-fase reversa (Figura 10). Após várias tentativas, com diferentes eluições, foram encontradas as condições para se obter uma melhor resolução do cromatograma que estão descritas na metodologia.

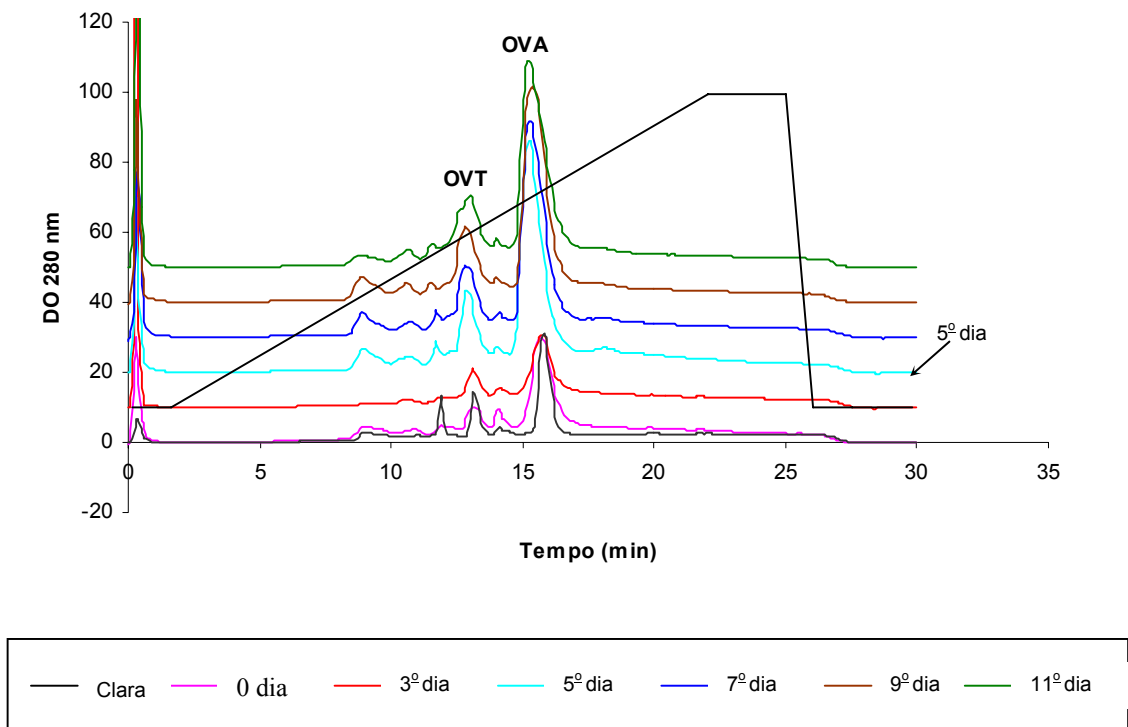


Figura 10: Caracterização de ovos de galinha embrionados e liofilizados, com diferentes dias de incubação, por CLAE-fase reversa.

Condições: unidades amostrais de ovos embrionados, liofilizados e reidratados em H₂O Milli-Q, dil 1/2; clara do ovo líq. dil. 1/250 como padrão; coluna: Vydac protein C4; eluente: água-acetonitrila 0,025% TFA gradiente: 7% ACN a 70% ACN; velocidade de fluxo: 0,8 mL/min; detecção UV: 280 nm.

Ao plotar o gráfico, verificou-se que as linhas ficavam sobrepostas, assim, adicionaram-se 10 pontos de DO no eixo das ordenadas, para cada dia de incubação (a partir do 3º dia), para uma melhor visualização do cromatograma.

Verifica-se na Figura 10 dois picos majoritários com tempos de retenção de 13 e 16 minutos, correspondendo aos tempos de retenção da ovotransferrina (OVT) e ovoalbumina (OVA), respectivamente, nas condições cromatográficas utilizadas.

Comparando os cromatogramas das amostras de ovos embrionados com diferentes dias de desenvolvimento, observa-se aumentos significativos nas áreas de pico OVT e OVA, a partir do 5º dia de incubação, representando aumento de concentração dessas proteínas (Figura 10). Portanto, as concentrações das proteínas variam com o tempo de desenvolvimento, sendo esta variação mais expressiva a partir do 5º dia, devido às biossínteses protéicas que ocorrem durante o processo de incubação.

Assim sendo, pode-se supor que os picos indicados como OVT e OVA correspondem às proteínas ovotransferrina e ovoalbumina, respectivamente, pois seus tempos de retenção coincidem com os das mesmas na clara de ovo líquida. O pico marcado com OVA corresponde ao encontrado por Croguennec et al. (2000), onde a ovoalbumina pura é eluída em um tempo de retenção de aproximadamente 15 minutos em CLAE-fase reversa utilizando a coluna Vydac protein C4 e as mesmas condições de eluição do presente trabalho.

Entretanto, esses dados não permitem afirmar, com certeza, que ocorre aumento somente nas concentrações de OVT e OVA. Segundo Nau et al. (1999), os picos da ovoalbumina apresentam uma série de contaminantes em baixa quantidade: ovomucóide, ovoglobulina, cistatina e ovoflavoproteína, pois todas estas proteínas possuem os valores de ponto isoelétrico muito próximos ao da ovoalbumina.

Para elucidar quais proteínas estão efetivamente presentes em maior quantidade a partir do 5º dia de incubação dos ovos embrionados, procedeu-se a separação das mesmas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e por eletroforese de focalização isoelétrica. Para ambos os métodos de eletroforese, em um primeiro momento, foi necessário otimizar as condições de separação das proteínas dos ovos embrionados, pois os métodos descritos na literatura são utilizados para separação das proteínas da clara do ovo (Guerin, 1991; Laemmli, 1970; Desert et al., 2001).

As análises por eletroforese SDS-PAGE das unidades amostrais dos ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de desenvolvimento foram

comparadas com a clara, com a gema líquidas, e com marcadores de peso molecular. Foram utilizados dois corantes diferentes para revelar as proteínas: azul de Coomassie (Figuras 11) e nitrato de prata (Figura 12).

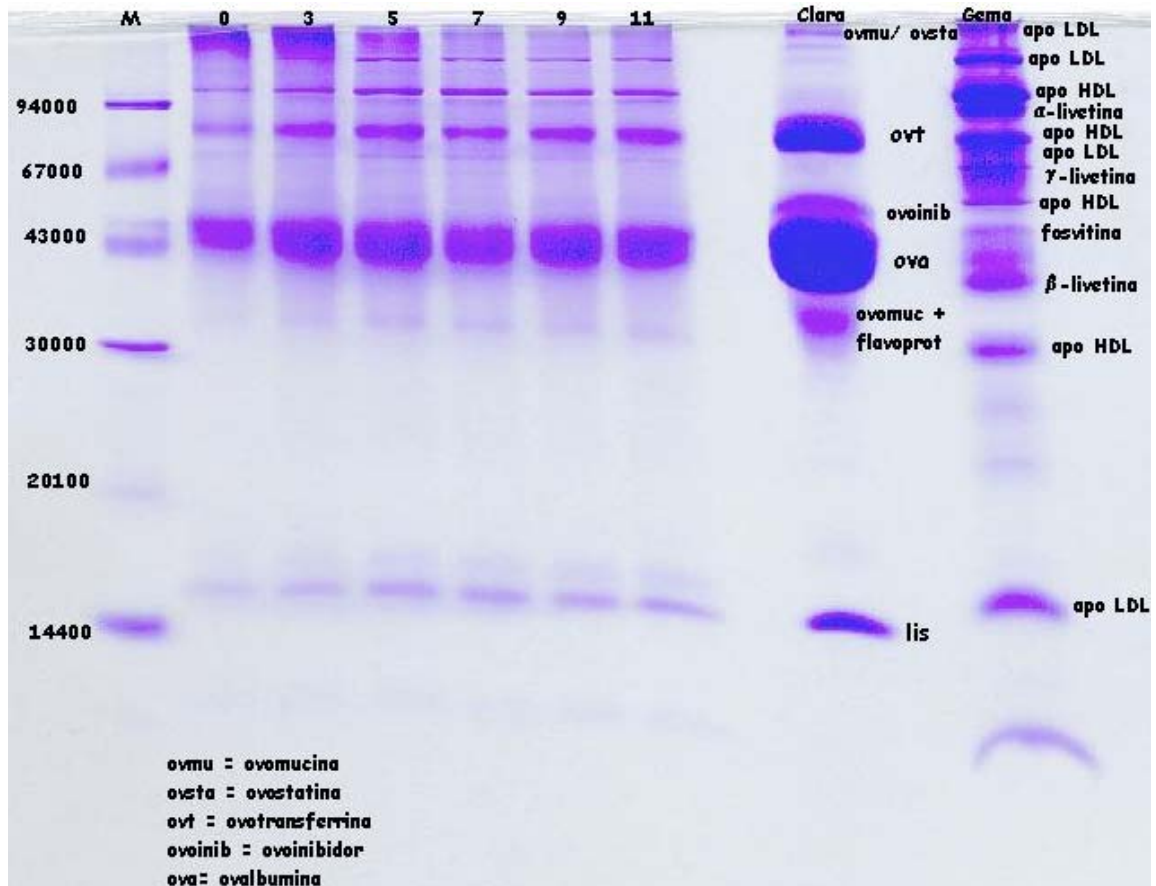


Figura 11: Caracterização de ovos de galinha embrionados e liofilizados, com diferentes dias de incubação, por eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% - SDS-PAGE (coloração: azul de Coomassie).

Depósito: 40 µL de solução a 2,5µg/µL de proteína.

M = marcador de peso molecular.

0,3,5,7,9 e 11 = ovos embrionados com diferentes dias de incubação.

Através dos dados obtidos, é possível afirmar que as bandas evidenciadas na Figura 11 correspondem às proteínas: ovomucina/ ovostatina, apoLDL, apoHDL, α-livetina, ovotransferrina, apoLDL, ovoinibidor, ovalbumina, fosvitina, β-livetina, ovomucóide + flavoproteína, apoHDL e lisozima, respectivamente, de cima para baixo. Os pesos moleculares identificados nas bandas conferem com os pesos moleculares

das proteínas correspondentes, publicados por Stevens (1991) e com dados de Awandé et al. (1994) e Croguennec et al. (2000).

Verifica-se na Figura 11, também, que as diferenças de concentração das frações protéicas nos diferentes dias de desenvolvimento ficam mais evidentes a partir do 5º dia, pois as bandas que correspondem às proteínas, como a apoLDL (>94kDa), apoHDL(> 94kDa), ovotransferrina e lisozima, ficam mais espessas. A banda ovomucina/ ovostatina diminui partir do 5º dia de incubação devido, provavelmente, à degradação da proteína ovomucina nessa fase do desenvolvimento onde se constata também que a clara se torna mais fluída.

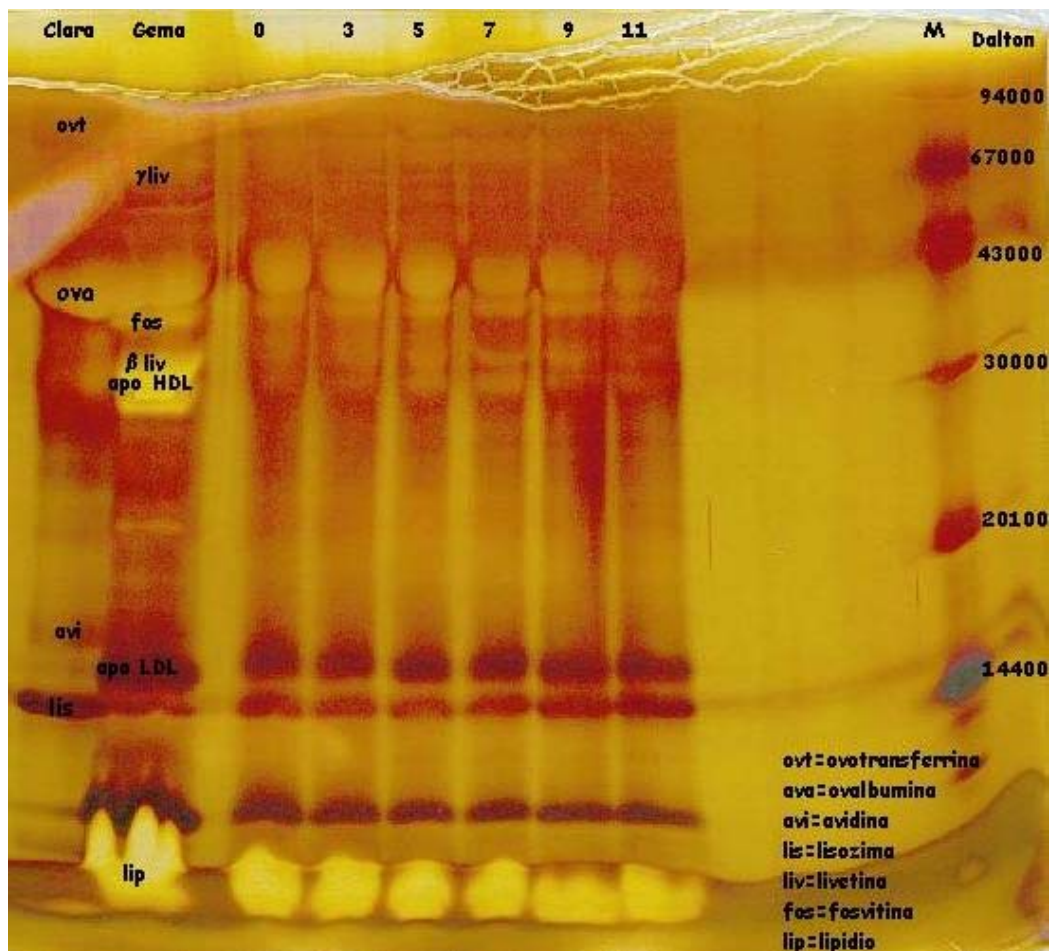


Figura 12: Caracterização de ovos de galinha embrionados e liofilizados, com diferentes dias de incubação, por eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% - SDS-PAGE (coloração nitrato de prata).

Depósito: 40 µL de solução a 2,5µg/µL de proteína.

M = marcador de peso molecular.

0,3,5,7,9 e 11 = ovos embrionados com diferentes dias de incubação.

Na Figura 12, as proteínas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% foram coradas com solução de nitrato de prata a 0,2%. A coloração por nitrato de prata é mais sensível, evidenciando proteínas presentes em baixas concentrações.

As bandas evidenciadas na Figura 12 correspondem às proteínas: ovotransferrina, γ -livetina, ovalbumina, fosvitina, β -livetina, apo HDL, avidina, apo LDL e lisozima, respectivamente, de cima para baixo. Os pesos moleculares identificados nas bandas também conferem com os pesos moleculares de cada proteína correspondente, de acordo com Stevens (1991), Awandé et al. (1994) e Croguennec et al. (2000).

Verificou-se que a coloração por nitrato de prata foi mais sensível na detecção das proteínas presentes em baixa concentração dos ovos embrionados e que a coloração com azul de Coomassie permitiu uma melhor visualização das diferenças entre a intensidade das bandas protéicas presentes em altas concentrações.

Os dados da Figura 12 apenas confirmam os dados observados na Figura 11, anteriormente mencionados.

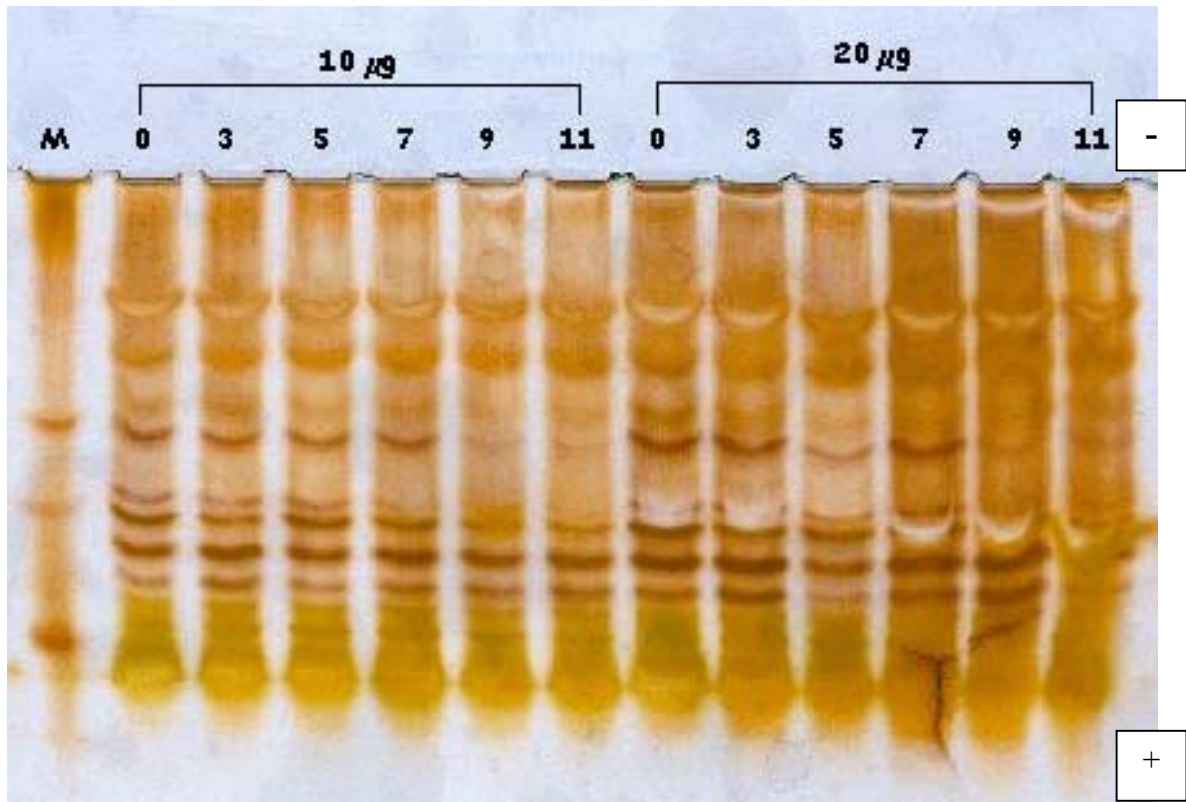


Figura 13: Caracterização de ovos de galinha embrionados e liofilizados, com diferentes dias de incubação, por eletroforese de focalização isoelétrica (pH 3-7).

Depósito: 10 µg e 20µg de proteína. Coloração: nitrato de prata.
 Parâmetros de migração : 1 h a 100 V, 2:30 h a 250 V e 2:30 h a 500 V.
 M = marcador de ponto isoelétrico.
 0,3,5,7,9 e 11 = ovos embrionados com diferentes dias de incubação.

A eletroforese de focalização isoelétrica apresentou-se como uma metodologia de separação mais sensível que SDS-PAGE para evidenciar as diferenças de concentração das proteínas entre os ovos férteis e embrionados nos diferentes dias de desenvolvimento, pois permite separar proteínas de pesos moleculares próximos, porém com pontos isoelétricos diferentes.

A Figura 13 também indica que há diferenças no perfil protéico dos ovos embrionados e liofilizados, nos diferentes dias de desenvolvimento. A observação de bandas espessas e outras apenas visíveis para a mesma proteína indicam que há diferenças de concentração dessa proteína em diferentes dias de incubação.

Segundo Desert et al. (2001), a eletroforese de focalização isoeétrica permite revelar as proteínas da clara de ovos, porém não as identifica. Em um gradiente linear de pH de 3 a 7, somente a avidina e a lisozima, cujos pontos isoeétricos são respectivamente 10 e 10,7, não são detectadas.

Csuka et al. (1973) também encontraram diferenças entre os perfis protéicos dos ovos embrionados com 7 dias de desenvolvimento e ovos inférteis, em ensaios com outros métodos de separação, utilizando eletroforese, e mencionam que há desintegração e biossíntese protéica durante o processo de incubação.

Os resultados permitem mostrar que a quantidade do aminoácido prolina e a mudança no perfil protéico estão associadas ao desenvolvimento dos tecidos e crescimento dos órgãos embrionários (Tabela 1 e Figuras 10, 11, 12 e 13). No 5º dia de incubação as diferenças dos perfis protéicos começam a ser evidenciadas, onde há um aumento da concentração das proteínas ovalbumina, ovotransferrina (Figuras 10 e 11) apoLDL, apoHDL e lisozima, e diminuição das concentrações das proteínas ovomucina e ovostatina, por estarem associadas ao desenvolvimento de tecidos e órgãos embrionários (Figuras 11 e 12). Cabe salientar que o papel destas proteínas é sustentar e proteger o embrião durante o seu desenvolvimento.

Para concluir, pode-se dizer que as técnicas eletroforéticas empregadas foram capazes de evidenciar as diferenças de concentração de proteínas nos diferentes dias de incubação: aumento da concentração de substâncias biologicamente ativas (proteínas: ovoalbumina, ovotransferrina, apoLDL, apoHDL e lisozima), e diminuição da concentração de outras substâncias (proteínas: ovomucina e ovostatina), evidenciando um metabolismo protéico intenso.

6.2 Determinação de ácidos graxos ω -3 e ω -6

Fatty acids ω -3 and ω -6 composition in freeze-dried chicken embryo eggs with different days of development é o título do artigo aceito para publicação no **Brazilian Archives of Biology and Technology** (ISSN 1516-8913) (Anexo 4, p.102). O resumo, a metodologia, os resultados e a discussão são apresentados a seguir:

6.2.1 Resumo

Foi determinada a composição em ácidos graxos ω -3, ω -6 e, em especial, o ácido docosahexaenóico (DHA) em ovos de galinha embrionados e liofilizados com períodos de incubação preestabelecidos. De acordo com os resultados obtidos, os ovos férteis e embrionados apresentaram a seguinte composição média de ácidos graxos saturados: palmítico ($23,18 \pm 0,54\%$) e esteárico ($7,70 \pm 0,28\%$); insaturados: palmitoléico ($3,00 \pm 0,19\%$), oléico ($36,28 \pm 0,58\%$), linoléico ($22,18 \pm 0,34\%$), linolênico ($1,08 \pm 0,04\%$), araquidônico ($2,04 \pm 0,03\%$) e DHA ($0,91 \pm 0,03\%$); total de ácidos ω -3 ($2,26 \pm 0,10\%$) e total ácidos ω -6 ($24,62 \pm 0,33\%$).

Verificou-se que não há diferenças significativas nos teores médios totais de ácido graxos ω -3 ($p=0,1226$), entre os ovos embrionados liofilizados com diferentes dias de incubação (3, 5, 7, 9 e 11 dias) e ovos férteis liofilizados (dia 0), sendo que os ovos embrionados apresentam uma média do teor destes ácidos 0,022 % inferior aos ovos férteis. Porém, houve diferenças significativas nos teores médios totais de ácidos graxos ω -6 ($p=0,0001$), sendo que os ovos embrionados apresentam uma média do teor destes ácidos 0,294 % superior aos ovos férteis. Também, há uma forte evidência estatística apresentada pelo modelo quadrático dos valores esperados do teor de DHA ($p=0,0013$).

Palavras-chave: ovos embrionados, ácidos graxos ω -3 e ω -6, DHA.

6.2.2 Metodologia

6.2.2.1 Composição em ácidos graxos

Os ácidos graxos foram determinados por cromatografia gasosa – CG, segundo o método oficial da AOCS (Ce 1f-96) adaptado por Abril e Barclay (1999), no qual, os ácidos graxos são identificados por comparação dos tempos de retenção de padrões e

quantificados por normatização de áreas, utilizando um cromatógrafo gasoso capilar (Perkin Elmer 8420) e uma coluna capilar de sílica fundida (CP-Sil-88, nº 985132, 50m x 0,25mm).

6.2.2.2 Delineamento estatístico

A casualidade para a escolha das unidades amostrais que foram analisadas foi garantida pelo uso da tabela de números aleatórios (Vieira e Hoffmann, 1989). Para a análise estatística dos dados, foi aplicada a análise de variância com contrastes e análise de regressão, utilizando os softwares STATISTICA for Windows versão 5.1 e SAS System for Windows versão 6.12.

6.2.3 Resultados e discussão

A composição em ácidos graxos de ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação, pode ser observada na Tabela 2.

Tabela 2: Média da composição em ácidos graxos em unidades amostrais de ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação.

Ácido graxo (%)		0	3	5	7	9	11
C14:0	Mirístico	0,32	0,30	0,36	0,32	0,32	0,27
C16:0	Palmítico	23,91	23,11	23,11	23,27	22,27	23,43
C16:1	Palmitoléico	3,00	3,02	3,19	3,00	3,14	2,64
C18:0	Estearico	7,66	7,87	7,37	7,77	7,43	8,12
C18:1	Oléico (ω - 9)	35,78	36,59	35,68	36,13	37,25	36,26
C18:2	Linoléico (ω - 6)	21,90	22,14	22,71	22,13	22,39	21,78
C18:3	Linolênico (ω - 3)	1,11	1,01	1,09	1,10	1,11	1,05
C20:3	Eicosatrienóico (ω - 6)	0,45	0,40	0,41	0,38	0,37	0,40
C22:0	Behênico	0,26	0,25	0,27	0,28	0,27	0,26
C20:4	Araquidônico (ω - 6)	2,02	2,09	2,04	2,05	2,00	2,05
C22:5	Docosapentaenóico (ω - 3)	0,22	0,16	0,37	0,30	0,30	0,30
C22:6	DHA (ω - 3)	0,95	0,89	0,86	0,90	0,91	0,94
	Total ω -3	2,28	2,06	2,32	2,30	2,32	2,29
	Total ω -6	24,37	24,63	25,16	24,56	24,76	24,23

Condições de análise: cromatógrafo gasoso capilar Perkin Elmer 8420; coluna capilar de sílica fundida CP-Sil-88, nº 985132, 50m x 0,25mm; tempo morto: 2,30 (138 segundos); fluxo da coluna: 1,07 mL/min; velocidade linear: 36cm/seg; temperatura do detector: 300 °C; temperatura do injetor: 270 °C; gás de arraste (He): 45 psi; eventos: relay 0,01 minuto ON; volume injetado: 1,0 μ L; éster metílico diluído para o dobro volume solvente método; Split: 1:55 (fluxo split + purga = 10 mL/ 10 seg, purga = 5 mL/ min); temperatura do forno: longa: 160°C – 10 min.; 160-200°C (4°C/min); 200°C – 20 min (tempo variável).

A Tabela 2 destaca que os ovos férteis e embrionados são fontes dos ácidos graxos saturados: palmítico (média de $23,18 \pm 0,54\%$) e estearico (média de $7,70 \pm 0,28\%$); insaturados: palmitoléico (média de $3,00 \pm 0,19\%$), oléico (média de $36,28 \pm 0,58\%$), linoléico (média de $22,18 \pm 0,34\%$), linolênico (média de $1,08 \pm 0,04\%$), araquidônico (média de $2,04 \pm 0,03\%$) e DHA (média de $0,91 \pm 0,03\%$). O resultado confere com as médias encontradas por Ferrier *et al.* (1995) para a composição de ácidos graxos em ovos usados como controle.

Bragagnolo e Turatti (1999) encontraram teores de DHA em “ovos light” (lipídios e colesterol reduzidos e enriquecidos com ácidos ω -3) em torno de 1,5%. Comparados com estes resultados, os ovos embrionados apresentaram teores de 0,6% inferiores aos ovos enriquecidos disponíveis no mercado.

Na Figura 14, podem ser observados os teores de ácidos graxos ω -3 e ω -6 de acordo com os dias de incubação em ovos de galinha embrionados e liofilizados. Os resultados obtidos indicam que os ovos férteis e embrionados representam uma boa fonte de ácidos graxos polinsaturados, inclusive ácidos graxos ω -3.

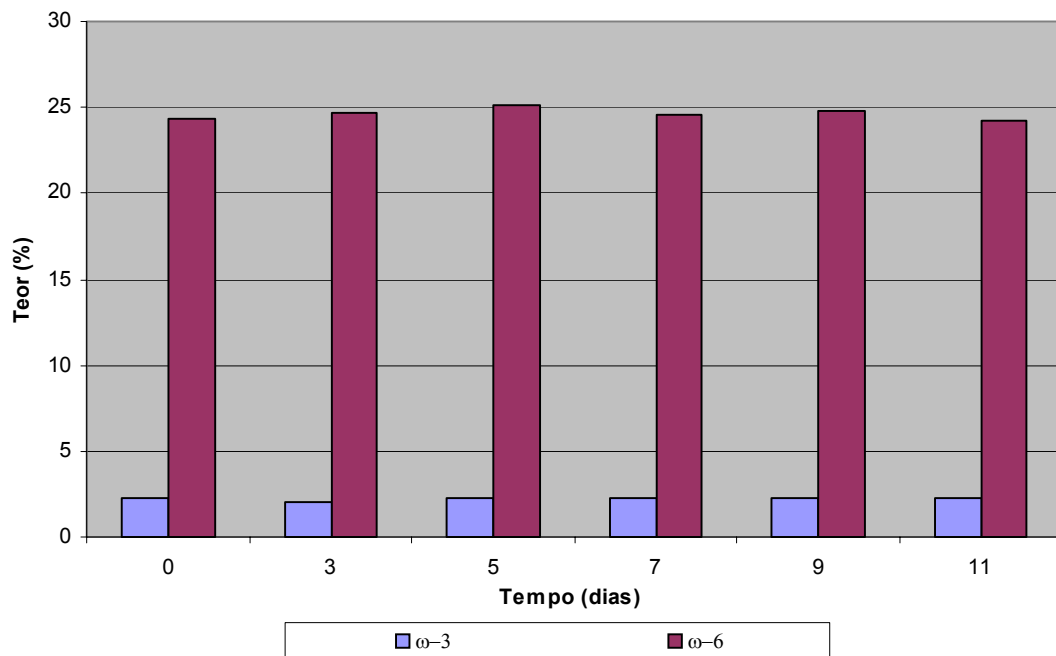


Figura 14: Teor de ácidos graxos ω -3 e ω -6 versus dias de incubação em ovos de galinha embrionados e liofilizados.

Na Tabela 3, pode ser observada a análise de variância com contrastes onde foram comparados os teores médios totais de ácidos graxos ω -3 e ω -6 dos ovos férteis (dia 0) com os dos ovos embrionados (3, 5, 7, 9 e 11).

Tabela 3: Análise de variância com contrastes do teor total em ácidos graxos ω -3 e ω -6 em ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação.

Contraste	Estimativa	F	Valor p
ω -3	-0,022	3,23	0,1226
ω -6	0,294	617,40	0,0001*

Verifica-se, na Tabela 3, que não houve diferenças significativas nos teores médios totais de ácido graxos ω -3, entre os ovos embrionados liofilizados com diferentes dias de incubação (3, 5, 7, 9 e 11 dias) e ovos férteis liofilizados (dia 0) ($p=0,1226$), sendo que os ovos embrionados apresentaram uma média do teor destes ácidos 0,022 % inferior aos ovos férteis. Porém, houve diferenças significativas nos teores médios totais de ácidos graxos ω -6, entre os ovos embrionados liofilizados com diferentes dias de incubação e ovos férteis liofilizados (dia 0) ($p=0,0001$). Os ovos embrionados apresentaram uma média do teor destes ácidos 0,294 % superior aos ovos férteis.

Noble e Cocchi (1990), também verificaram que há mudanças na composição de ácidos graxos ω -6 e ω -9 durante o processo de incubação, e relatam que embora a composição e distribuição de ácidos graxos da fração triglicerídeos dentro da gema e do saco vitelínico permaneça inalterada, há mudanças expressivas na fração éster de colesteril e fosfolipídios.

Pesquisas têm mostrado que mais de 90% da energia total requerida pelo embrião é fornecida pela β -oxidação de ácidos graxos derivados dos lipídios da gema (Noble e Cocchi, 1990; Cherian e Sim, 1993 ; Farkas et al., 1996a ; Speake et al., 1996, 1998).

Maldjian et al., (1995) mencionam que o ácido araquidônico (ω -6) é relativamente resistente à β -oxidação durante a embriogênese e que há atividades de conversão de ácido linoléico a ácido araquidônico no saco vitelínico. Cherian et al. (1997) também sugerem que a concentração do ácido araquidônico e do ácido docosahexaenóico (DHA) são diferentes durante a incubação, pois estes ácidos apresentam um padrão de transferência da gema para o embrião diferente dos demais, e são dependentes do suprimento proveniente da gema.

Estão representadas, na Tabela 4 e Figura 15, a análise de regressão e o diagrama de dispersão do teor de DHA em ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação.

Tabela 4: Análise de regressão do teor de DHA em ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação.

Causas de variação	F	Valor p
linear	0,13	0,7347
quadrático	31,99	0,0013*

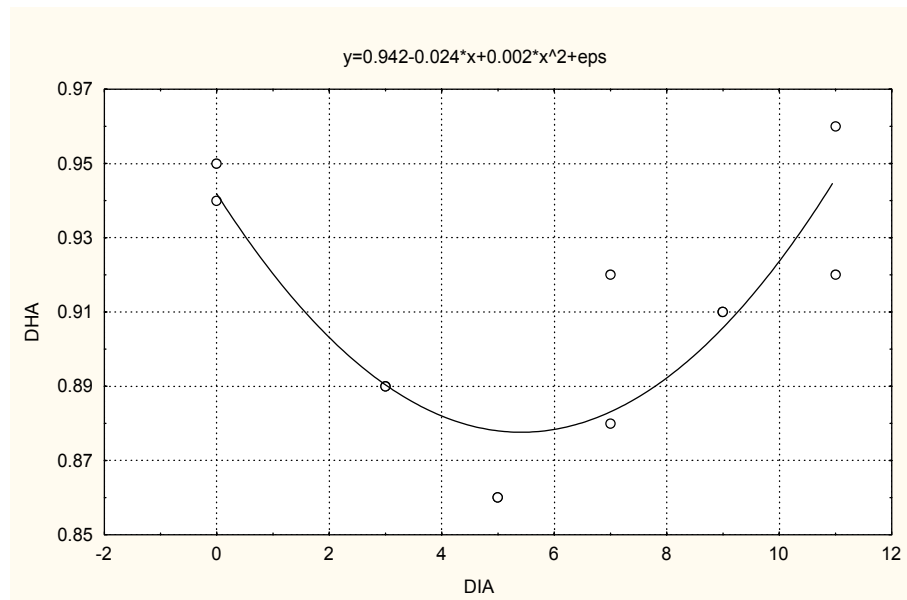


Figura 15: Diagrama de dispersão do teor médio de DHA (%) em unidades amostrais de ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação.

Verificou-se, na Tabela 4 e Figura 15, que há uma forte evidência estatística apresentada pelo modelo quadrático dos valores esperados do teor de DHA ($p=0,0006$), o qual deu origem à seguinte equação:

$$\% \text{ de DHA} = 0,942 - 0,02\text{dias} + 0,0022 \text{ dias}^2$$

Uma provável explicação para este modelo é que no 5º dia de desenvolvimento, as frações fosfolipídicas que contêm o DHA são preferencialmente retiradas da gema pelo saco vitelínico, antes do maior período de crescimento do embrião.

No 5º dia de desenvolvimento, o saco vitelínico, estrutura extra-embriônica que tem como uma das funções remodelar estruturas lipídicas relacionadas aos conteúdos de DHA, já está completa e circunda toda a gema (Noble e Cocchi, 1990; Speake et al., 1998). Farkas et al. (1996a) mencionam que há saída preferencial de fosfolipídios contendo o DHA da gema para a membrana desta estrutura. Também, há evidências de que dentro da membrana do saco vitelínico, o DHA é translocado da fração derivada dos fosfolipídios da gema para ser incorporado à fração triacilglicerol das lipoproteínas que serão lançadas na circulação do embrião (Cerolini et al., 1996; Farkas et al., 1996a; Cherian et al., 1997; Speake et al., 1998).

Os resultados permitem concluir que o desenvolvimento do embrião de galinha entre os dias 0 e 11 de incubação não altera os teores médios totais de ácidos ω -3, mas altera os teores médios totais de ácidos ω -6. O ácido docosahexaenóico (DHA) é, preferencialmente, retirado da gema, a partir do 5º dia de incubação, antes do maior período de crescimento do embrião, por estar associado ao crescimento e ao desenvolvimento dos tecidos e dos órgãos do sistema nervoso. Portanto, os ovos férteis e embrionados demonstram ser fontes de ácidos graxos de cadeia longa ω -3 ω -6 como o DHA e o ácido araquidônico, e podem contribuir para suprir a carência dos mesmos na dieta humana.

6.3 Determinação dos elementos minerais (potássio, sódio, magnésio e cálcio)

Determinação dos elementos minerais (potássio, sódio, magnésio e cálcio) em ovos de galinha embrionados e liofilizados é o título do artigo submetido para publicação na revista **Ciências da Saúde** (ISSN 0101-9546)(Anexo 5, p.109). O resumo, a metodologia, os resultados e a discussão são apresentados a seguir:

6.3.1 Resumo

Foi determinada a composição em elementos minerais (K, Na, Mg e Ca) em ovos de galinha embrionados e liofilizados com períodos de incubação preestabelecidos. De acordo com os resultados obtidos, os ovos embrionados apresentaram a seguinte composição média total de elementos minerais: potássio ($7728,06 \pm 179,01$ ppm), sódio ($5217,62 \pm 194,19$ ppm), magnésio ($521,35 \pm 52,11$ ppm) e cálcio ($3019,43 \pm 130,58$ ppm). Verificou-se que existem diferenças significativas nos teores médios dos minerais potássio, sódio e magnésio, entre os ovos embrionados liofilizados com diferentes dias de incubação (dias 3, 5, 7, 9 e 11) e ovos férteis liofilizados (dia 0). Os ovos embrionados apresentaram, em média, um teor de K 1237,08 ppm superior, de Na 689,75 ppm superior e de Mg 21,00 ppm inferior aos ovos férteis. Porém, não foram encontradas diferenças significativas nos teores médios de cálcio ($p=0,9195$), sendo que os ovos embrionados apresentaram uma média do teor deste mineral 9,91 ppm superior aos ovos férteis. Os ovos embrionados podem ser, portanto, fonte destes minerais e contribuir para minimizar a carência dos mesmos na dieta humana.

Palavras-chave: ovos embrionados, elementos minerais (K, Na, Mg e Ca).

6.3.2 Metodologia

6.3.2.1 Teor dos elementos minerais

Os teores dos elementos minerais potássio, sódio, magnésio e cálcio (K, Na, Mg e Ca) dos ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de desenvolvimento foram determinados segundo o protocolo de dosagem de minerais na clara do ovo, baseado nas metodologias elaboradas por Le Graët (1999a, 1999b), utilizando um espectrofotômetro de absorção atômica de chama (Varian, SpectrAA 300,

Paris, França), a um comprimento de onda de 766,5 nm para o potássio, 589 nm para o sódio, 285,2 para o magnésio e 422,7 nm para o cálcio, respectivamente. O aparelho é equipado com um queimador de ar-acetileno e lâmpadas de cátodo K-Na e Ca-Mg.

6.3.2.2 Delineamento estatístico

A casualidade para a escolha das unidades amostrais, que foram analisadas, foi garantida pelo uso da tabela de números aleatórios (Vieira e Hoffmann, 1989). Para a análise estatística dos dados, foi aplicada a análise de variância com contrastes utilizando o software SAS System for Windows versão 6.12.

6.3.3 Resultados e discussão

Os teores médios dos elementos minerais potássio, sódio, magnésio e cálcio (K, Na, Mg e Ca) em ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5: Média do teor dos minerais (ppm) em unidades amostrais de ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação.

Dias	Potássio (K)	Sódio (Na)	Magnésio (Mg)	Cálcio (Ca)
0 (fértil)	6490,987 ±159,5083	4527,87 ±13,9781	542,3500 ±4,82152	3009,513 ±154,6776
3	7719,807 ±158,9388	5112,24 ± 8,5916	479,2500 ±6,14878	3058,463 ±150,5594
5	7774,350 ±116,5843	5032,18 ±11,7696	488,1600 ±6,89592	3053,257 ±157,7246
7	7448,827 ±128,5762	5177,61 ±20,3259	490,4233 ±7,56329	2824,290 ±142,4826
9	7945,876 ±100,8977	5539,58 ±12,6943	600,8267 ±7,05285	2980,597 ±150,7207
11	7751,463 ± 91,5543	5226,48 ± 5,3409	548,0767 ±7,24980	3180,527 ±154,0813

Verifica-se na Tabela 5, que os ovos embrionados (dias 3, 5, 7, 9 e 11) são fontes dos elementos minerais potássio (teor médio total de 7728,06 ± 179,01 ppm), sódio (teor médio total de 5217,62 ± 194,19 ppm), magnésio (teor médio total de 521,35 ± 52,11 ppm) e cálcio (teor médio total de 3019,43 ± 130,58 ppm). Este resultado confere, aproximadamente, com as médias encontradas por Stadelman e Cotterill (1986) para a composição de minerais em ovos inteiros.

Na Figura 16, podem ser observados os teores médios dos elementos minerais médios de K, Na, Mg e Ca de acordo com os dias de desenvolvimento em ovos de galinha embrionados e liofilizados.

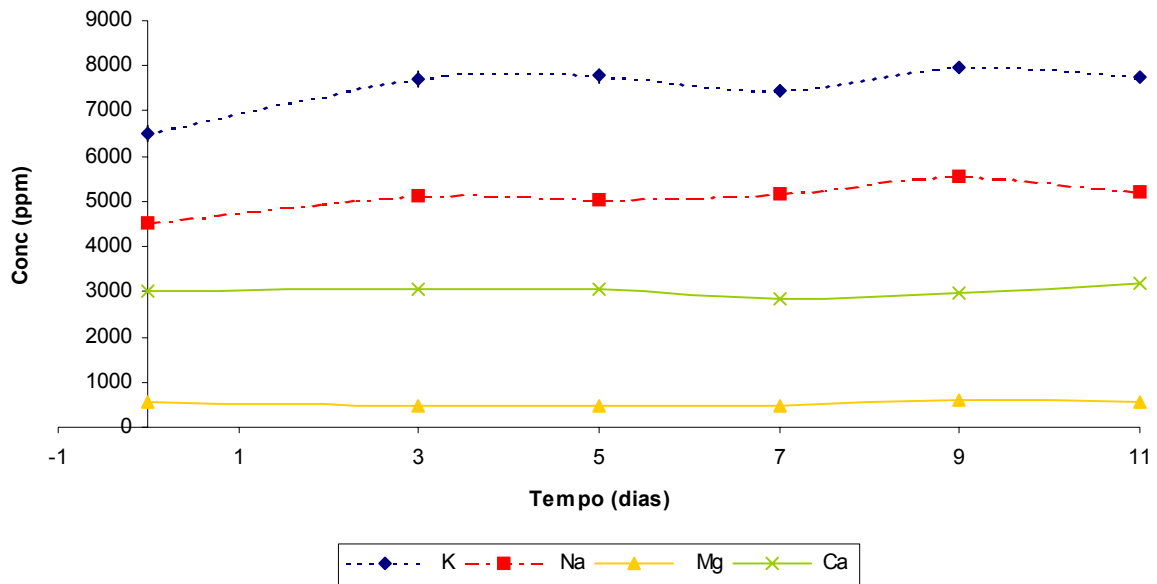


Figura16: Variação dos elementos minerais com tempo de incubação (dias).

Na Tabela 6, pode ser observada a análise de variância com contraste, onde foram comparados os teores médios dos minerais K, Na, Mg e Ca dos ovos férteis (dia 0) com os dos ovos embrionados (dias 3, 5, 7, 9 e 11).

Tabela 6: Análise de variância com contrastes dos teores médios dos minerais K, Na, Mg e Ca em ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação

Contraste	Estimativa	F	Valor p
K	1237,08	230,96	0,0001*
Na	689,75	7061,94	0,0001*
Mg	-21,00	24,68	0,0003*
Ca	9,91	0,01	0,9195

Verifica-se na Tabela 6 que há diferenças significativas nos teores médios dos minerais potássio ($p=0,0001^*$), sódio ($p=0,0001^*$) e magnésio ($p=0,0003^*$) entre os ovos embrionados liofilizados com diferentes dias de incubação (dias 3, 5, 7, 9 e 11) e ovos férteis liofilizados (dia 0), sendo que os ovos embrionados apresentam uma média do teor de K 1237,08 ppm superior, de Na 689,75 ppm superior e de Mg 21,00 ppm inferior aos ovos férteis. Porém, não há diferença significativa nos teores médios de cálcio entre os ovos embrionados liofilizados com diferentes dias de incubação e ovos férteis liofilizados (dia 0) ($p=0,9195$), sendo que os ovos embrionados apresentam uma média do teor de mineral 9,91 ppm superior aos ovos férteis.

Richards (1997) menciona que a membrana da gema é quem serve como sítio de armazenamento de minerais porque ela tem a função de regular o aporte de minerais durante o desenvolvimento do embrião.

Os resultados permitem concluir que, durante o desenvolvimento do embrião de galinha entre os dias 0 e 11 de incubação, houve alteração dos teores médios totais dos elementos minerais potássio, sódio e magnésio, mas não alterou o teor total do cálcio. Convém salientar que esses elementos estão associados ao desenvolvimento de tecidos e crescimento dos órgãos embrionários, como a formação dos ossos, bico e penas, a partir do 7^o dia de incubação. O ovo, por ser um ambiente fechado, sofre influência externa mínima, por conseguinte, quase não há alterações nutricionais. O aporte desses minerais se dá pela mobilização dos mesmos, presentes na gema e também na casca, que é uma estrutura rica em minerais, principalmente em carbonato de cálcio.

Portanto, comparando-se os ovos férteis e embrionados com outros alimentos de origem animal, verifica-se que os mesmos demonstram ser fontes dos elementos minerais potássio, sódio, magnésio e cálcio, e podem contribuir para minimizar a carência dos mesmos na dieta humana.

6.4 Determinação de ácido siálico

Determinação dos teores de ácidos siálicos em ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de desenvolvimento, é o título do artigo aceito para publicação na revista **Ciências da Saúde** (ISSN 0101-9546) (Anexo 6, p.117). O resumo, a metodologia, os resultados e a discussão são apresentados a seguir:

6.4.1 Resumo

Foi realizada a determinação dos teores dos ácidos siálicos em ovos de galinha embrionados e liofilizados com períodos de incubação preestabelecidos, dadas as potencialidades deste ácido no desenvolvimento de uma nova classe de fármacos antivirais. De acordo com os resultados obtidos, os ovos férteis e embrionados apresentaram os seguintes teores médios de ácidos siálicos: $628,61 \pm 29,72 \mu\text{moles}\%$ (dia 0), $638,38 \pm 4,11 \mu\text{moles}\%$ (dia 3), $642,86 \pm 32,73 \mu\text{moles}\%$ (dia 5), $480,83 \pm 39,72 \mu\text{moles}\%$ (dia 7), $530,37 \pm 18,67 \mu\text{moles}\%$ (dia 9) e $614,01 \pm 3,96 \mu\text{moles}\%$ (dia 11). Também, há uma forte evidência estatística apresentada pelo modelo cúbico dos valores esperados dos ácidos siálicos ($p=0,0001$). Os ovos embrionados podem ser, portanto, fonte destes ácidos.

Palavras-chave: ovos embrionados, ácidos siálicos.

6.4.2 Metodologia

6.4.2.1 Determinação dos teores dos ácidos siálicos

A determinação dos teores dos ácidos siálicos livres em ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de desenvolvimento foi realizada, segundo a metodologia descrita por Warren (1959), utilizando uma centrífuga Beckman modelo Avanti TM30 Centrifuge (Pablo Alto, California, EUA) e um espectrofômetro Milton Roy modelo Spectronic 1201 acoplado com um micro-registrador (Quarry Bay, Hong Kong). Foram analisadas 3 unidades amostrais de cada dia de incubação.

6.4.2.1 Delineamento estatístico

A casualidade para a escolha das unidades amostrais foi garantida pelo uso da tabela de números aleatórios (Vieira e Hoffmann, 1989). Para a análise estatística dos dados, foi aplicada a análise de regressão, utilizando-se os softwares STATISTICA for Windows versão 5.1 e SAS System for Windows versão 6.12.

6.4.3 Resultados e discussão

Os teores médios dos ácidos siálicos livres em ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação podem ser observados na Figura 17.

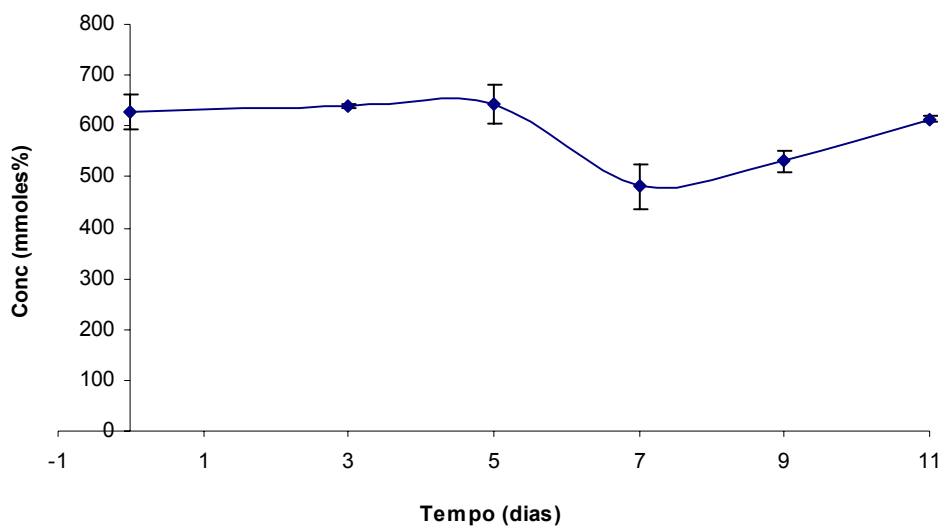


Figura 17: Teores médios dos ácidos siálicos livres em ovos de galinha embrionados e liofilizados versus diferentes dias de incubação.

De acordo com os resultados obtidos, os ovos férteis e embrionados apresentaram os seguintes teores médios dos ácidos siálicos livres: 628,61 ± 29,72 μmoles% (dia 0), 638,38 ± 4,11 μmoles% (dia 3), 642,86 ± 32,73 μmoles% (dia 5), 480,83 ± 39,72 μmoles% (dia 7), 530,37 ± 18,67 μmoles% (dia 9) e 614,01 ± 3,96 μmoles% (dia 11).

Estes resultados conferem com as médias de 566,67 e 400,00 $\mu\text{moles}\%$ para a clara e gema desidratadas, respectivamente, encontradas por Warren (1959).

Segundo Nakano et al. (1994), a concentração dos ácidos siálicos são: $13,7 \pm 0,5$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ (4400 $\mu\text{moles}\%$) na membrana da gema; $5,1 \pm 0,2$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ na chalaza (1600 $\mu\text{moles}\%$); $5,2 \pm 0,4$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ (1700 $\mu\text{moles}\%$) na gema; $2,2 \pm 0,3$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ (700 $\mu\text{moles}\%$) na clara e $0,6 \pm 0,1$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ (200 $\mu\text{moles}\%$) nas membranas da casca.

Na Tabela 7 e Figura 18 estão representadas a análise de regressão e o diagrama de dispersão dos teores dos ácidos siálicos em ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação.

Tabela 7: Análise de regressão dos teores dos ácidos siálicos em ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação.

Causas de variação	F	Valor p
linear	20,34	0,0007
quadrático	8,84	0,0116
cúbico	51,45	0,0001*

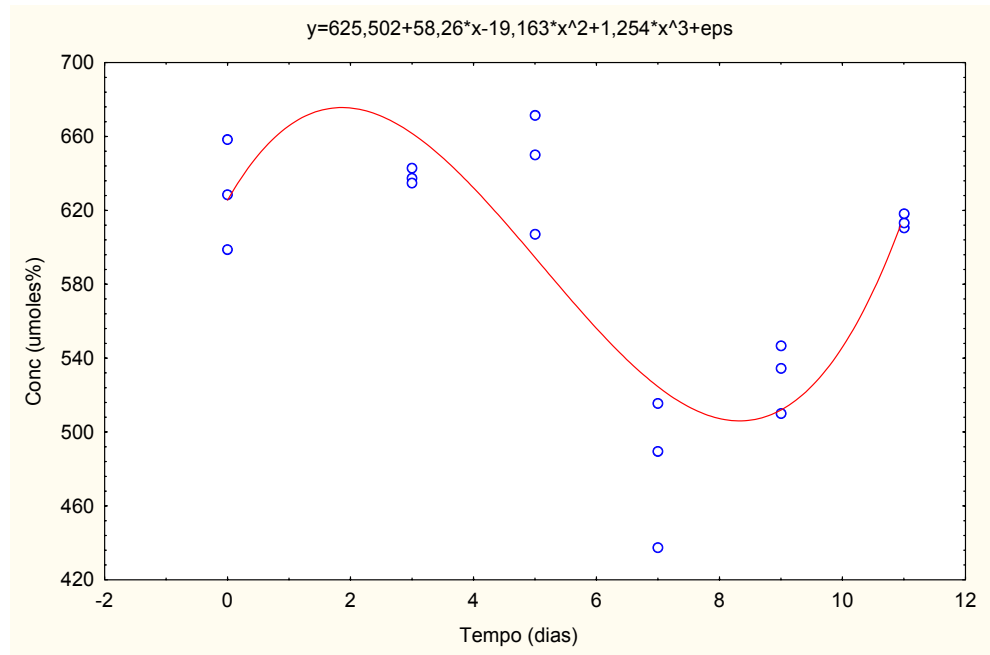


Figura 18: Diagrama de dispersão dos teores dos ácidos siálicos em unidades amostrais de ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação.

Verifica-se na Tabela 7 e Figura 18, que há uma forte evidência estatística de que o modelo cúbico está associado com os valores esperados dos teores dos ácidos siálicos ($p=0,0001$), que deu origem à seguinte equação:

$$\% \text{ de ácido siálico} = 625,502 + 58,26 \text{ dias} - 19,163 \text{ dias}^2 + 1,254 \text{ dias}^3$$

Entende-se que as diferenças de concentração desses ácidos, nos ovos embrionados durante a incubação, são devidas a modificações conformacionais e destruição de complexos. Sauveur (1973) menciona que a fração β da ovomucina é rica em ácido siálico, e que há diminuição desta fração logo após a postura atribuída à diminuição da clara e à destruição do complexo ovomucina-lisozima.

Os resultados permitem concluir que o desenvolvimento do embrião de galinha entre os dias 0 e 11 de incubação altera os teores dos ácidos siálicos e o modelo cúbico está associado aos valores esperados. No 5º dia de incubação, houve uma diminuição dos teores destes ácidos provocada pela retração e liquefação da clara, e destruição do

complexo ovomucina-lisozima. Cabe salientar que estes ácidos estão ligados à proteína ovomucina e o papel desta proteína é proteger o embrião durante o seu desenvolvimento. Portanto, os ovos férteis e embrionados até o 5º dia de incubação demonstram ser fontes de ácidos siálicos, podendo-se prever uma potencial ação antiviral para esses ovos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS, CONCLUSÃO E PROPOSTAS DE PESQUISA

7.1 Considerações finais

Este trabalho mostrou que os ovos embrionados apresentam características físico-químicas diferentes das dos ovos férteis, e essas são mais evidentes a partir do 5^o dia de incubação, pois foram encontradas variações expressivas no perfil protéico, no teor de ácidos graxos ω -6 e ácido docosahexaenóico (DHA), nos teores de alguns minerais (potássio, sódio e magnésio), e na quantidade de ácido siálico. A explicação provável é que, no 5^o dia de desenvolvimento, ocorre um intenso metabolismo protéico, modificações conformacionais e formação de complexos, anteriores ao maior período de crescimento do embrião, por estarem associados ao desenvolvimento de tecidos e órgãos específicos.

Os minerais potássio, sódio, magnésio e cálcio, avaliados no estudo, são necessários à formação dos ossos, bicos e penas. Também, no 5^o dia de desenvolvimento, algumas estruturas extra-embriônicas, como as membranas amniótica, carioalantoínica e o saco vitelínico estão completas e em plena atividade, ocorrendo mobilização de componentes como o DHA, que está associado ao crescimento e ao desenvolvimento dos tecidos e dos órgãos do sistema nervoso.

Noble e Cocchi (1990) relatam que, uma vez iniciada a incubação, o começo do desenvolvimento do embrião de galinha é confinado à migração e rearranjo de células dentro do disco germinativo, pois o ovo fornece um ambiente fechado à todas as influências nutricionais, exceto simples trocas gasosas e mudanças de umidade. Esses autores mencionam, ainda, que o metabolismo dos carboidratos e o das proteínas predominam durante as duas primeiras semanas de desenvolvimento do embrião de galinha.

Speake et al. (1998) relatam, porém, que no 5^o dia de desenvolvimento, a maioria dos órgãos e tecidos já pode ser identificada, e, no 10^o dia, o embrião tem sua aparência reconhecida.

No nosso conhecimento este trabalho é a primeira investigação das proteínas dos ovos de galinha embrionados por eletroforese SDS-PAGE e eletroforese de focalização isoelétrica. Para atingir este objetivo foram necessárias adaptações das técnicas existentes para a análise das proteínas da clara e da gema de ovo, pois foram utilizadas unidades amostrais liofilizadas, para as quais não foram feitas as separações prévias da clara, gema e embrião. As técnicas eletroforéticas empregadas foram capazes de evidenciar as diferenças de concentração de proteínas nos diferentes dias de incubação: aumento da concentração de substâncias biologicamente ativas (proteínas: ovoalbumina, ovotransferrina, apoLDL, apoHDL e lisozima), e diminuição de outras substâncias (proteínas: ovomucina e ovostatina), evidenciando um metabolismo protéico intenso. Mais investigações são necessárias para confirmar quais as proteínas são metabolizadas durante o desenvolvimento embrionário. Para atingir esta meta já existem técnicas disponíveis: *western blotting* e imunoenaios com anticorpos específicos para proteínas já evidenciadas, tais como: lisozima, ovoalbumina, ovotransferrina e ovomucina, e análise proteômica por gel bidimensional, onde se realiza, primeiramente, a separação por focalização isoelétrica e, posteriormente, a separação por peso molecular (SDS-PAGE). Esta última técnica, recentemente desenvolvida, possui grande poder de resolução e alta reprodutividade. (Desert et al, 2001).

7.2 Conclusões

- ✓ A metodologia empregada para o preparo das unidades amostrais dos ovos de galinha embrionados e liofilizados, produzidos neste experimento, foi adequada do ponto de vista higiênico-sanitário.
- ✓ As proteínas dos ovos embrionados e liofilizados demonstraram ser fontes de aminoácidos essenciais, tais como: treonina, valina, metionina, isoleucina, fenilalanina, histidina e arginina.
- ✓ Os ovos de galinha embrionados e liofilizados apresentaram diferentes teores do aminoácido prolina e diferentes perfis protéicos.
- ✓ No 5^o dia de incubação foi observado um aumento da concentração das proteínas ovalbumina, ovotransferrina, apoLDL, apoHDL e lisozima, e diminuição da concentração das proteínas ovomucina e ovostatina.
- ✓ As técnicas eletroforéticas SDS-PAGE e eletroforese de focalização isoeétrica foram capazes de evidenciar as diferenças de concentração de proteínas nos diferentes dias de incubação.
- ✓ Os ovos férteis e embrionados demonstraram ser fontes de ácidos graxos ω -6 e ω -3 (ácido docosahexaenóico – DHA) os quais são importantes para a dieta humana. Apresentaram um teor de DHA de apenas 0,6% inferior ao dos ovos enriquecidos, e o modelo quadrático está associado com os valores esperados.
- ✓ Houve diferenças significativas nos teores médios totais de ácidos graxos ω -6, sendo que os ovos embrionados (dias 3,5,7,9 e 11 de incubação) apresentaram uma média do teor destes ácidos de 0,29 % superior aos ovos férteis (dia 0).
- ✓ Os ovos férteis e embrionados demonstraram ser fontes dos elementos minerais potássio, sódio, magnésio e cálcio, e podem contribuir para minimizar a carência dos mesmos na dieta humana.
- ✓ Os ovos de galinha embrionados e liofilizados demonstraram ser fonte de ácidos siálicos, podendo-se prever uma potencial ação antiviral para esses ovos.

7.3 Propostas de pesquisas futuras

- ✓ Realizar uma pesquisa qualitativa para verificar a maneira de preparação destes ovos embrionados pela população amazônica.
- ✓ Verificar se os ovos embrionados apresentam mecanismos de resistência ao crescimento de bactérias específicas relacionadas com o trato respiratório, como o *Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*.
- ✓ Estudar as potenciais propriedades antivirais dos ovos embrionados liofilizados.
- ✓ Quantificar os teores médios totais de colesterol dos ovos embrionados liofilizados.
- ✓ Pesquisar o valor biológico dos nutrientes dos ovos embrionados liofilizados.
- ✓ Realizar uma nova caracterização físico-química separando o embrião dos demais componentes do ovo embrionado no 5^o dia de incubação.
- ✓ Determinar as proteínas que são metabolizadas durante o desenvolvimento embrionário, utilizando as técnicas *western blotting*, imunoensaaios com anticorpos específicos para proteínas e análise proteômica.
- ✓ Determinar compostos orgânicos ativos por espectrofotometria de massa.
- ✓ Pesquisar os hormônios de crescimento e respostas imunológicas das principais frações dos ovos embrionados liofilizados com diferentes dias de desenvolvimento. Esta pesquisa já está sendo realizada em colaboração com a Dr^a Hélène-Marie Thérien do Groupe en Recherches Biomédicales – Département de Chimie-Biologie – Université du Québec à Trois-Rivières – Canadá.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, Y.; ITOH, T.; ADACHI, S. Fractionation and characterization of hen's egg yolk phosphatidylcholine. **Journal of Food Science**, v. 47, p.1903, 1982.

ABRIL, R.; BARCLAY, B. **Fatty acid analysis of poultry eggs as methyl esters**. Bolder, Co. (USA): OmegaTech., 1999. Método OT-GCPE, Rev. 3.1, 24/03/99.

AL-MASHIKHI, S. A.; NAKAI, S. Separation of ovotransferrin from egg white by immobilized metal affinity chromatography. **Agricultural Biological Chemistry**, v.51, n.11, p.2881-2887, 1987.

ARIKI, J. A.; MACHADO, C. R.; BRAGAGNOLO, N. Effect of different oil sources on performance and egg yolk cholesterol content in laying hens. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON THE QUALITY OF EGGS AND EGGS PRODUCTS, 8, set., 1999, Bologna, Itália. **Anais da Associazione Italiana di Avicoltura Scientifica**. Bologna (Itália): Instituto di Zootecnia, set., 1999. v.2, p.223-225.

AWANDÉ, A. C.; MOREAU, S.; MOLLÉ, D.; BRULÉ, G.; MAUBOIS, J-L. A two-step chromatographic procedure for purification of hen egg white ovomucin, lysozyme, ovotransferrin and ovalbumin, and characterization of purified proteins. **Journal of Chromatography**, v.677, p.279-288, 1994.

BARON, F.; GAUTIER, M.; BRULE, G. Factors involved in the inhibition of growth of *Salmonella enteritidis* in liquid egg white. **Journal of Food Protection**, v.60, n.11, p.1318-1323, 1997.

BECKER, C. C.; KYLE D. J. Developing functional foods containing algal docosahexaenoic acid. **Food Technology**, v.52, n.7, p.68-52, July 1998.

BEIG, D.; GARCIA, F. C. M. **O embrião de galinha**. Campo Grande: UFMS/ Imprensa Universitária, 1986. 36p.

BOUTONNIER, J-L.; POLIGNY, E. Aliments à votre bonne santé. **Revue des ENIL**, n.228, p.7-12, fev. 2000.

BRAGAGNOLO, N.; TURATTI, J. M. Evaluation of "light" eggs in Brazil. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON THE QUALITY OF EGGS AND EGGS PRODUCTS, 8, set., 1999, Bologna, Itália. **Anais da Associazione Italiana di Avicoltura Scientifica**. Bologna (Itália): Instituto di Zootecnia, set., 1999. v.2, p.177-181.

BRAKE, J.; WALSH, T. J.; BENTON Jr. C. E.; PETITTE, J. N.; MEIJERHOF, R.; PENALVA, G. Egg handling and storage. **Poultry Science**, v.76, n.1, p.144-151, Jan. 1997.

CEROLINI, S.; SPEAKE, Brian K.; MALDJIAN, A.; NOBLE, R. C. Preferential mobilisation of docosahexaenoic acid from adipose tissue triacylglycerol of the chick embryo. **Biochemical Society Transactions**, v.24, n.2, p.165S, May 1996.

CHERIAN, G.; GOPALAKRISHNAN, N.; AKIBA, Y.; SIM, J.S. Effect of maternal dietary n-3 fatty acids on the accretion of long-chain polyunsaturated fatty acids in the tissues of developing chick embryo. **Biology of Neonate**, v.72, n.3, p. 165-174, 1997.

CHERIAN, G.; SIM, J. S. Omega-3 fatty acid and cholesterol content of newly hatched chicks from α -linolenic acid enriched eggs. **Lipids**, v.27, n.9, p.706-710, 1992.

CHERIAN, G.; SIM, J. S. Net transfer and incorporation of yolk n-3 fatty acids into developing chick embryos. **Poultry Science**, v.72, n.1, p.98-105, 1993.

CONNOR, W. E. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, n.1, p.171S-175S, Jan. 2000. Suplemento.

CROGUENNEC, T.; NAU, F.; PEZENNEC, S.; BRULE, G. Chromatographic heterogeneity of ovotransferrin from hen egg white. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON THE QUALITY OF EGGS AND EGGS PRODUCTS, 8, set., 1999, Bologna, Itália. **Anais da Associazione Italiana di Avicoltura Scientifica**. Bologna (Itália): Instituto di Zootecnia, set., 1999. v.2, p. 47-53.

CROGUENNEC, T. **Influence de l'environnement ionique sur la structure et la fonctionnalité des protéines du blanc d'oeuf de poule**. 2000. Tese (Mention: Physico-Chimie et Qualité des Bioproduits) – L'École Nationale Supérieure Agronomique de Rennes, Rennes, França.

CROGUENNEC, T.; NAU, F.; PEZENNEC, S.; BRULE, G. Simple rapid procedure for preparation of large quantities of ovalbumin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.10, p.4883-4889, 2000.

CZUKA, J.; NOVY, J.; JIROSOVÁ, Z. Electrophoretic study of incubated infertile eggs. **Poultry Science**, v.14, p.203-204, 1973.

DANNHARDT, G.; KREHER M.; NOWE U.; PIES, A. Non-steroidal anti-inflammatory agents, Part 20. Method for testing non-steroidal anti-inflammatories: the modified hen's egg chorioallantoic membrane test (HET-CAM test) compared to other procedures. **Archiv for Pharmacy**, v.329, n.6, p.301-310, June 1996.

DE BOECK, S.; STOCKX, J. Egg white lysozyme is the major protein of the hen's egg vitelline membrane. **International Journal of Biochemistry**, v.18, n.7, p.617-622, 1986.

DESERT, C.; GUÉRIN-DUBIARD, C.; NAU, F.; JAN, G.; VAL, F.; MALLARD, J. Comparison of different electrophoretic separations of hen egg white proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.10, p.4553-4561, 2001.

DIAS, P. R. **Estudo da ação de fatores físicos e químicos sobre a morfogênese de embriões de *Gallus gallus domesticus*, com ênfase no desenvolvimento do sistema nervoso central.** 1996. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Comportamento) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

EWIN, J. **O lado sadio das gorduras: ácidos graxos essenciais para uma vida e uma aparência saudáveis.** Rio de Janeiro: Campus, 1997. 162p.

FARKAS, K.; NOBLE, R. C.; SPEAKE, B. K. Development changes in the levels of molecular species of triacylglycerol that contain docosahexaenoic acid in adipose tissue of chick embryo. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, v.115, n.1, p.1-6, Sept. 1996 a.

FARKAS, K.; RATCHFORD, I. A. J.; NOBLE, R. C.; SPEAKE, B. K. Changes in the size and docosahexaenoic acid content of adipocytes during chick embryo development. **Lipids**, v.31, n.3, p.313-321, Mar. 1996 b.

FEENEY R. E.; RHODES, M. P.; ANDERSON, J. S. The distribuion and role of sialic acid in chicken egg white. **The Journal of Biological Chemistry**, v.235, n. 9, p.2633-2637, Sept. 1960.

FERRIER, L. K.; CASTON, L. J.; LEESON, S.; SQUIRES, J.; WEAVER, B. J.; HOLUB, B. J. α -linolenic acid – and docosahexaenoic acid – enriched eggs from hens fed flaxseed: influence on blood lipids and platelet phospholipid fatty acids in human. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.62, n.1, p.81-86, 1995.

FUKUDA, S. P. **Estudo de metodologia quantitativa para a determinação espectrofotométrica de ácido siálico em leite.** 1994. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

GUERIN, C. **Fractionnement et hydrolyse enzymatique de proteines du blanc d'oeuf.** 1991. Tese (Mention: Sciences Chimiques) – Université de Rennes I, Rennes, França.

HAMAD, A. J. S. **Contribution a la connaissance et a la maitrise des mecanismes de transfert de technologie.** Lyon, 1992. 195p. Tese (Doutorado) – Departament de Sciences Economiques et de Gestion, Universite Lumiere Lyon 2, Lyon, França.

HARDY, C. T.; YOUNG, S. A.; WEBSTER, R. G.; NAEVE, C. W.; OWENS R. J. Egg fluids and cells of the chorioallantoic mebrane of embryonated chicken eggs can select different variants of Influenza A (H3N2) viruses. **Virology**, v.211, p.302-305, 1995.

HARTMANN, C.; WILHELMSON, M. The hen's egg yolk: a source of biologically active substances. **World's Poultry Science Journal**, v.57, p.13-28, Mar. 2001.

HORN, J. D. Egg as a raw material. **Chemistry and Industry**, p.437-440, June 1977.

HOUILLON, C. **Embriologia**. São Paulo: E. Blücher, EDUSP, 1972. 160p.

INOUE, S.; LIN, S-L; INOUE, Y. Chemical analysis of the developmental pattern of polysialylation in chicken brain: Expression of only an extended form of polysialyl chains during embryogenesis and the presence of disialyl residues in both embryonic and adult chicken brains. **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, n.39, p. 29968-29979, Sept. 29 2000.

JIANG, Z.; SIM, J. S. Consumption of n-3 polyunsaturated fatty acid-enriched eggs and changes in plasma lipids of human subjects. **Nutrition**, v.9, n.6, p.513-518, Nov./Dec. 1993.

JUNQUEIRA, L. C. **Noções básicas de citologia, histologia e embriologia**. 11.ed. Rio de Janeiro: Nobel, 1978. 185p.

KANAI, M.; SOJI, T.; SUGAWARA, E.; WATARI, N.; OGUCHI, H.; MATSUBARA, M.; HERBERT D. C. Participation of endodermal epithelial cells on the synthesis of plasma LDL and HDL in chick yolk sac. **Microscopy Research and Technique**, v. 35, n.4, p.340-348, Nov.1 1996.

KARAGENC, L.; CINNAMON, Y.; GINSBURG, M.; PETITTE, J. N. Origin of primordial germ cells in prestreak chicken embryo. **Development of Genetics**, v.19, n.4, p.290-301, 1996.

KATO, A.; MIYACHI, N.; MATSUDOMI, N.; KABAYASHI, K. The role of sialic acid in functional properties of ovomucin. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.51, n.3, p.641-645, 1987.

KIJOWSKI, J.; LESNIEROWSKI, G.; FABISZ-KIJOWSKA, A. Isolation of egg white lysozyme, enzyme polymeric forms and its antibacterial activity. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON THE QUALITY OF EGGS AND EGGS PRODUCTS, 8, set., 1999, Bologna, Itália. **Anais da Associazione Italiana di Avicoltura Scientifica**. Bologna (Itália): Instituto di Zootecnia, set., 1999. v.2, p. 361-371.

KUKSIS, A. Yolk Lipids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1124. p.205-222, 1992.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.259, p.680-685, 1970.

LE GRAËT, Y. Méthode d'analyse chimique: MO-METHO 0017 (calcium et magnésium). **Institut National de la Recherche Agronomique (INRA-Rennes)**, 22/11/99 a.

LE GRAËT, Y. Méthode d'analyse chimique: MO-METHO 0018 (potassium et sodium). **Institut National de la Recherche Agronomique (INRA-Rennes)**, 23/11/99 b.

- LI-CHAN, E.; NAKAI, S.; SIM, J.; BRAGG, D. B.; LO, K.V. Lysozyme separation from egg white by cation exchange column chromatography. **Journal of Food Science**, v. 51, n.4, 1986.
- LIN, D. S.; CONNOR, W. E.; ANDERSON, G. J. The incorporation of n-3 and n-6 essential fatty acids into chicken embryo from eggs yolks having vastly different fatty acid compositions. **Pediatric Research**, v. 29, n.6, p.601-605, 1991.
- MALDJIAN, A.; NOBLE, R. C.; SPEAKE, B. K. The transfer of docosahexaenoic acid from the yolk to the tissues of the chick embryo. **Biochemical Society Transactions**, v.21, p.297S, 1993.
- MALDJIAN, A.; FALKAS, K.; NOBLE, R. C.; COCCHI, M.; SPEAKE, B. K. The transfer of docosahexaenoic acid from the yolk to the tissues of chicken embryo. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1258, p.81-99, 1995.
- MALDJIAN, A.; CRISTOFORI, C.; NOBLE, R. C.; SPEAKE, B. K. The fatty acid composition of brain phospholipids from chicken and duck embryos, **Comparative biochemistry and physiology**, v.115B, n.2, p. 153-158, 1996.
- MINEKI, M.; KOBOYASHI, M. Microstructure of yolk from fresh eggs by improved method. **Journal of Food Science**, v.62, n.4, p.757-761, 1997.
- MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 4 ed. New York (USA): John Wiley & Sons, 1997. 703p.
- MOORE, S. C. On the determination of cystine as cysteic acid. **The Journal of Biological Chemistry**, v.283, p.235-237, 1963.
- NAKANO, K.; NAKANO, T.; AHN, Du; SIM, J. S. Sialic-acid contents in chicken eggs and tissues. **Canadian Journal of Animal Science**, v.74, n 4, p.601-606, Dec. 1994.
- NAU, F.; MALLARD, A.; PAGES, J.; BRULE, G. Reversed-phase liquid chromatography of egg white proteins: optimization of ovalbumin elution. **Journal of Liquid Chromatography & Rel. Technology**, v.22, n.8, p.1129-1147, 1999.
- NETTLETON, J. A. **Omega-3 fatty acids and health**. New York (USA): Chapman & Hall, 1995. 359p.
- NEWSLETTER. Duluth: Hubbard GA (USA), n.14, Aug., 2001. 4p.
- NOBLE, R. C. Egg lipids. In: WELL, R. G.; BELYAVIN, C. G. (eds.) **Egg quality: current problems and recent advances**. London (England): Butterworths, 1987. p.159-177.
- NOBLE, R. C.; COCCHI, M. Lipid metabolism and the neonatal chicken. **Progress in Lipid Research**, v.29, p.107-140, 1990.

PARKINSON, T. L. Separation of the proteins of egg white and egg yolk and a study of their interactions in whole egg. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 23, p.665-670, 1972.

PURINA. **Sítios & quintais: ração para aves criação caseira**. Canoas (RS): Agribands do Brasil, 2000.

RICHARDS, M. P. Trace mineral metabolism in avian embryo. **Poultry Science**, v.76, n.1, p.152-164, Jan. 1997.

SALATIN, J. **Pastured poultry profits**. Virginia (USA): Polyface Swoope, 1993. 330p.

SAUVEUR, B. Relation entre les acides sialiques de l'ovomucine et la hauteur du gel d'albumen de l'oeuf. **Journées de Recherches Avicoles et Cunicoles**, p.311-315, Dec. 1973.

SCHNEIDER, M. Egg lipids: processing and application. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON THE QUALITY OF EGGS AND EGGS PRODUCTS, 8, set., 1999, Bologna, Itália. **Anais da Associazione Italiana di Avicoltura Scientifica**. Bologna (Itália): Instituto di Zootecnia, set., 1999. v.2, p. 381-385.

SEKO, A.; KOKETSU, M.; NISHIZONO, M.; ENOKI, Y.; IBRAHIM, H. R.; JUNEJA, L. R.; KIM, M.; YAMAMOTO, T. Occurrence of sialylglycopeptide and free sialylglycans in hen's egg yolk. **Biochemica et Biophysica Acta**, v.1335, n.1/2, p.23-32, 1997.

SHAND, J. H.; WEST, D. W.; NOBLE, R. C.; SPEAKE, B. K. The esterification of cholesterol in the liver of the chick embryo. **Biochimica et Biophysica Acta**, n.1213, p.224-230, 1994.

SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in chromatography of amino-acids. **Analytical Chemistry**, v.30, p.1190-1206, 1958.

SPEAKE, B. K.; NOBLE, R. C.; McCARTNEY, R. J. Tissue-specific changes in lipid composition and lipoprotein lipase activity during the development of chick embryo. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1165, n.3, p.263-270, 1993.

SPEAKE, B. K.; McCARTNEY, R. J.; FEAST, M.; MALDJIAN, A.; NOBLE, R. C. The relationship between the fatty acid profiles of the yolk and the embryonic tissue lipids: A comparison between the lesser black backed gull (*Larus fuscus*) and the pheasant (*Phasianus colchicus*). **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, v.115, n.4, p.493-499, Dec. 1996.

SPEAKE, B. K.; MURRAY, A. M. B.; NOBLE, R. C. Transport and transformations of yolk lipids during development of avian embryo. **Progress in Lipid Research**, v.37, n.1, p.1-32, 1998.

STADELMAN, W. J.; COTTERILL, O. J. (eds.) **Egg science and technology**. 3.ed. Westport (England): Avi , 1986. p.345-383.

STADELMAN, W. J.; OLSON, V. M.; SHEMWELL, G. A.; PASCH, S. **Egg and poultry-meat processing**. Chichester (England): Ellis Horwood Ltd., 1988. 211p.

STADELMAN, W. J.; PRATT, D. E. Factors influencing composition of the hen's egg. **World's Poultry Science Journal**, v.45, p.247-261, Nov. 1989.

STADELMAN, W. J. World's poultry science association invited lecture: The incredibly functional egg. **Poultry Science**, n. 78, p.807-811, 1999.

STEVENS, L. Mini-review:Egg white proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.100B, n.1, p.1-9, 1991.

SVENDSEN, L.; CROWLEY, A.; OSTERGAARD, L. H.; STODULSKI, G.; HAU, J. Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk. **Laboratory Animal Science**, v.45, n.1, p.89-93, Feb. 1995.

TANIZAKI, H.; TANAKA, H.; IWATA, H.; KATO, A. Activation of macrophages by sulfated glycopeptides in ovomucin, yolk membrane, chalazae in chicken eggs. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.61, n.11, p.1883-1889, 1997.

THAPON, J-L. **Effets de divers facteurs sur les proprietes physico-chimiques et fonctionnelles du blanc d'oeuf**. 1981. Tese (Titre de Docteur-Ingenieur en Sciences Agronomiques - Spécialité: Productions Animales et Technologie des Produits Animaux) - L'École Nationale Supérieure Agronomique de Rennes en association avec l' Université de Rennes I, Rennes, França.

THAPON, J-L.; BOURGEOIS C-M. **L'oeuf et les ovoproduits**. Paris (France): Lavoisier -Technique et Documentation, 1994. 344p.

TUNON, P.; JOHANSSON, K. E. Yet another improved silver staining method for detection of proteins in polyacrylamide gels. **Journal of Biochemistry and Biophysical Methods**, v. 9, n.2, p.171-179, 1984.

VIEIRA, A. V.; KUCHLER, L.; SCHNEIDER, W. J. Retinol in avian oogenesis: molecular properties of carrier protein. **DNA and Cell Biology**, v.14, n.5, p.403-410, May 1995 a.

VIEIRA, P. M.; VIEIRA, A. V.; SANDERS, E. J.; STEYRER, E.; NIMPF, J.; SCHNEIDER, W. J. Chicken yolk contains bona fide high density lipoprotein particles. **Journal of Lipid Research**, v. 36, n.3, p. 601-610, 1995 b.

VIEIRA, S., HOFFMANN, R. **Estatística experimental**. São Paulo: Atlas, 1989. 179p.

VOET, D.; VOET, J. **Biochemistry**. 2. ed. New York (USA): John Wiley & Sons, 1995. p.764-769.

WARREN, L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. **The Journal of Biological Chemistry**, v.234, n.8, p.1971-1975, Aug. 1959.

ANEXOS

Anexo 1

POTENCIALIDADES TECNOLÓGICAS DO EMBRIÃO DE GALINHA (*Gallus gallus domesticus*, L.).

Célia Maria Teixeira de Campos¹, Antônio José Simões Hamad², José Carlos Fiad Padilha³

Resumo: Este trabalho reúne informações sobre as potencialidades tecnológicas do embrião de galinha. As informações foram obtidas pelos autores em dois anos de pesquisa na UFSC. A falta de informação neste assunto sugere um enorme campo de pesquisa a ser prosseguido nesta área.

Unitermos: embrião de galinha, potencialidades tecnológicas.

Abstract: This paper presents information about the technological potentiality of a chicken embryo. The information was obtained by the authors in two years of research as a part of the UFSC work. The lack of information on these subject suggests that there is a promising area to be explored.

Key Words: chicken embryo, technological potentiality .

1 – Introdução

A busca de fontes alternativas de alimentos para o alívio da fome e de medicamentos para dor, deve ter sido um dos gestos instintivos do homem pré-histórico e deve ter tido remotas origens.

O desenvolvimento dos seres vivos despertou, muito cedo, a curiosidade do espírito humano; possivelmente refletindo o interesse acerca da sua própria existência (Miller, 1984).

Os primeiros dados de investigações de pesquisas com embrião de aves são de Aristóteles, século IV a.C., na Grécia antiga. Porém, como na maioria das áreas da ciência, os primeiros avanços da embriologia só foram conseguidos durante o período do Renascimento, com a descoberta do microscópio ótico no final do século XVI e da noção da célula no século XVII, quando o embrião de galinha foi amplamente estudado pelos biólogos Willian Harvey e

Marcello Malpighi (Cowen & Helfand, 1990; Speake et al., 1998).

No final do século XIX, houve um aumento da disponibilidade de acesso ao estudo de aves domésticas e o embrião de galinha se tornou um organismo clássico para a pesquisa na área de embriologia de vertebrados (Speake et al., 1998). A embriologia, como ciência, só se desenvolveu no final deste século pelo aperfeiçoamento de técnicas histológicas, onde se estudou o desenvolvimento do ovo de galinha e se estabeleceu a primeira base embriológica fundamental (Houillon, 1972).

Desde a antiguidade, ovos de galinha com embrião têm sido empregados como alimento e empiricamente na terapia de doenças.

Também, os ovos não fecundados de aves sempre foram largamente empregados na alimentação humana (Beig & Garcia, 1986).

1 - Professora Msc. do Departamento de Ciências Farmacêuticas – CCS – UFSC.

2 - Professor Dr. do Departamento de Ciências e Tecnologia dos Alimentos – CCA – UFSC.

3 - Professor Dr. do Departamento de Zootecnia – CCA – UFSC.

Sob o ponto de vista nutritivo, os ovos de galinha com embrião e os não fecundados, sempre foram um dos alimentos mais completos que o homem teve a sua disposição. Dos três elementos essenciais para uma boa dieta (proteínas, lipídios e carboidratos), os ovos contém, principalmente, os dois primeiros além de incluir vitaminas e elementos minerais (Oliveira et al., 1982; Richards, 1997). Convém ressaltar, no entanto, que o alto valor nutritivo de um ovo está relacionado com o desenvolvimento do embrião (Beig & Garcia, 1986; Finkler et al., 1998).

Do ponto de vista de suas propriedades terapêuticas, alguns trabalhos estão sendo realizados mostrando que o embrião de galinha tem atividade antiinflamatória não esteroidal e antiviral em estudos associados ao vírus HIV da AIDS (Dannhardt et al., 1996; Nakamura et al., 1997). Com os avanços de técnicas de biologia molecular, atualmente, ele também tem sido utilizado como inóculo e substrato em pesquisas com outros vírus (Payne et al., 1992); como expressão genética e padrão de formação do desenvolvimento do cérebro, comportamento, mecanismo da memória e outros aspectos do desenvolvimento psíquico na embriogênese (Speake et al., 1998). Neste artigo pretende mostrar o potencial de aproveitamento deste produto utilizando um levantamento bibliográfico e a “árvore de desenvolvimento tecnológico” como ferramenta de trabalho.

2 - Metodologia

A metodologia utilizada neste trabalho foi desenvolvida pelo professor Hamad em 1992. Consiste na elaboração de uma árvore de desenvolvimento tecnológico baseado na síntese das informações levantadas, a qual pode ser dividida nas seguintes regiões:

- Raiz: nesta região relacionam-se as ciências e tecnologias genéricas.
- Tronco: nesta região relacionam-se as tecnologias específicas (potencial tecnológico e industrial).
- Ramos: nesta região relacionam-se as técnicas genéricas e/ou técnicas especiais.
- Galhos: nesta região relacionam-se as técnicas específicas.
- Frutos: nesta região relacionam-se os produtos obtidos.

Neste modelo, convencionou-se denominar técnica ao conhecimento de uma maneira de fazer específica (*know-how*) e tecnologia como o conjunto de técnicas que tem como objetivo a transformação de uma matéria-prima em um produto acabado.

3 – Resultado – prospecção mercadológica

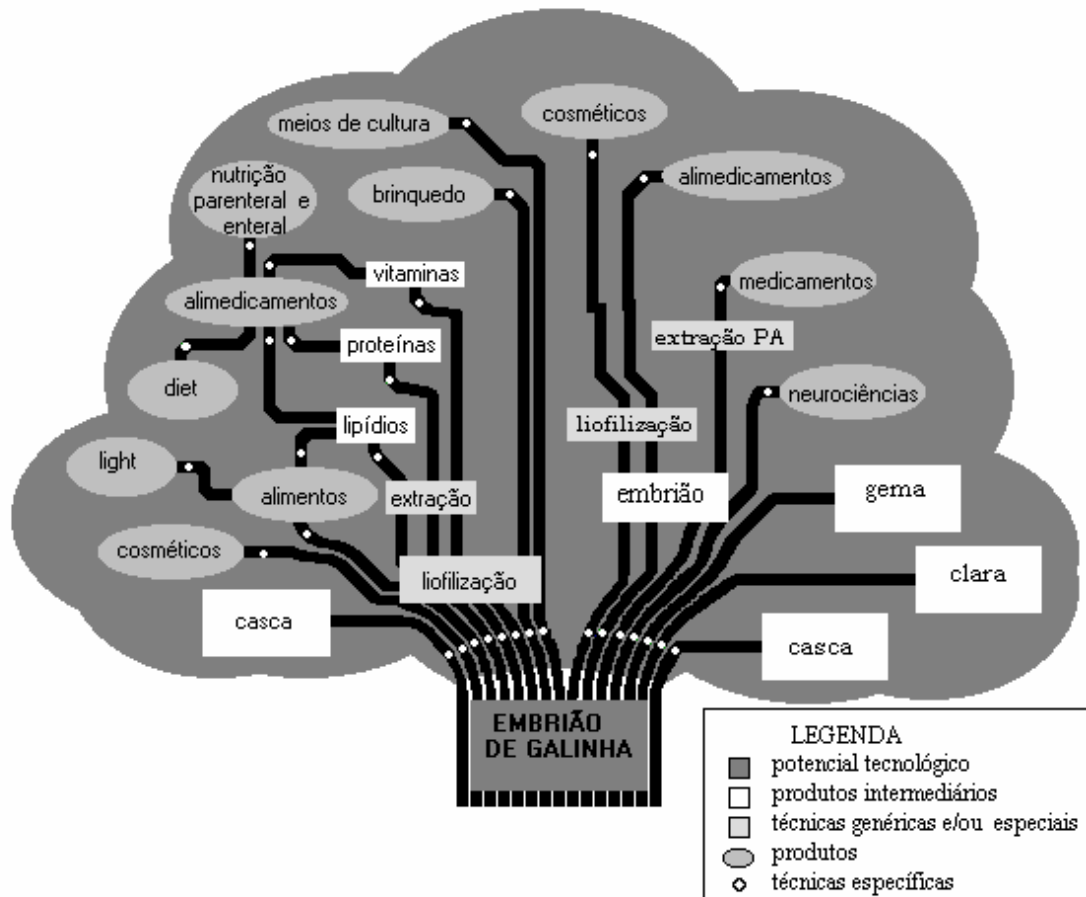


FIGURA 1: Árvore tecnológica do embrião de galinha

3.1 - Leitura técnica da árvore

Desde a antiguidade o embrião e o ovo não fecundado de galinha têm sido considerados como alimentos humanos importantes como o leite: altamente nutritivos, fáceis de preparar e de fácil digestão. Há alguns anos, no entanto, a ciência começou a avaliar esses produtos

pelas suas qualidades terapêuticas e nutritivas.

O ovo não fecundado, passou a ser visto como um vilão pois sua gema contém elevados níveis de colesterol que é prejudicial à saúde. O embrião, no entanto, passou a despertar um grande interesse tecnológico, pois foi comprovado o seu

importante valor nutricional e terapêutico. O seu consumo é limitado principalmente por:

- Dificuldade em conservá-lo, transformá-lo e transportá-lo;
- Seu aspecto.

Na árvore da FIGURA 1 já é possível identificar o método de conservação escolhido. Justifica-se a escolha da liofilização como sendo um método ideal para a conservação deste produto. Os constituintes do embrião de galinha são altamente sujeitos a alterações por vários agentes, como o calor, o oxigênio e a umidade e graças à congelação brusca e intensa a que substâncias a liofilizar são submetidas, estas conservam todas as propriedades que possuíam no momento da congelação, mantendo-se integralmente após secas por sublimação do gelo formado. A liofilização transforma o produto em pó, facilitando a conservação e embalagem, portanto, não há mais problemas relacionados ao seu consumo.

Na árvore tecnológica (FIGURA 1), verifica-se a multiplicidade do uso do embrião de galinha. O primeiro passo é a separação da casca. Esta pode ser utilizada no preparo de rações para animais, adubos para plantas e outros usos.

A árvore (FIGURA 1), divide-se em dois grandes ramos:

- O ramo da esquerda onde é sugerido o processo de liofilização do embrião acompanhado da gema e clara.
- O ramo da direita onde o embrião é separado destes componentes.

3.2 - Utilização industrial e comercial

Conforme se constata na legenda (FIGURA 1), os grupos de produtos são mostrados da seguinte maneira:

No ramo da esquerda o embrião é liofilizado juntamente com a gema e a clara. O produto obtido pode ser utilizado:

- Como matéria-prima na indústria de cosméticos no preparo de xampus, cremes restauradores da queratina capilar, bases para maquiagem, entre outros.
- Já na indústria de alimentos como ingrediente no preparo de maionese, molhos para salada, bolos, biscoitos, cereais, farinhas, leite em pó, sobremesas (flan, pudim), docinhos, sopas, salgadinhos, massas e potinhos para bebê.
- Na de extração de lipídios obtendo-se um concentrado protéico livre de gorduras (incluindo o colesterol) para a indústria de alimentos tipo “light” e ácidos graxos essenciais que poderão ser utilizados como matéria-prima de alimedicamentos¹.
- Na extração de proteínas e vitaminas que poderão ser utilizadas na fabricação de alimedicamentos como a nutrição enteral (incluindo dietas para astronautas, mergulhadores, alpinistas, etc), nutrição parenteral e também alimentos dietéticos tipo “diet”.
- Na formulação de meios de cultura para inóculos de bactérias e vírus e também na fabricação de brinquedos de morder para bebês.

1 – Alimedicamentos são alimentos que não servem apenas para matar a fome e fornecer energia ao organismo, mas contribuem para melhorar a saúde das pessoas reduzindo o risco de doenças alterando as funções do corpo humano.

No ramo da direita o embrião é separado da gema, da clara e da casca:

- A gema e a clara podem ser utilizadas na indústria de diversas formas: líquidas, congeladas, desidratadas por atomização ou por liofilização, no preparo de diversos tipos de alimentos.
- O embrião isolado pode servir de substrato em pesquisas na área de neurociências e como matéria-prima na extração de princípios ativos para indústria farmacêutica apresentados aos pacientes na forma de soluções, suspensões, pós, comprimidos e cápsulas. Também, pode sofrer um processo de liofilização e servir de adjuvante no preparo de alimedicamentos e cosméticos como loções e cremes rejuvenescedores.

4 - Conclusão

Após a consulta bibliográfica realizada, constata-se que esse assunto, pelo menos ao nível de Brasil, é incipiente. Portanto, é enorme o campo de pesquisa e trabalho a ser prosseguido na área em epígrafe. Para se continuar avançando é imperativo que mais pesquisas sejam realizadas com investimentos adequados.

O ensaio de prospecção realizado com o auxílio da árvore tecnológica é uma síntese das informações levantadas e precisa ainda de retoques e atualizações à medida que as pesquisas avançarem onde mais galhos e frutos surgirão.

Referências bibliográficas

- BEIG, Darwin, GARCIA, Fernando C. M. **O embrião de galinha**. Campo Grande: UFMS/ Imprensa Universitária, 1986. 36p.
- COWEN, David L., HELFAND, William H. **Pharmacy-history**. New York: Harry N. Abrams, Inc., Pub., 1990. 272p.
- DANNHARDT, G., KREHER M., NOWE U., PIES, A. Non-steroidal anti-inflammatory agents, Part 20. Method for testing non-steroidal anti-inflammatories: the modified hen's egg chorioallantoic membrane test (HET-CAM test) compared to other procedures. **Arch. Pharm.** v.329, n.6, p.301-310, Jun. 1996.
- FINKLER, M. S., VAN ORMAN, J. B., SOTHERLAND, P. R. Experimental manipulation of egg quality in chicken: influence of albumen and yolk on size and body composition of near-term embryos in a precocial bird. **J. Comp. Physiol.** v.168, n.1, p.17-24, Feb. 1998.
- HAMAD, A.J.S. **Contribution a la connaissance et a la maitrise des mecanismes de transfert de technologie**. Lyon, 1992. 195p. Tese (Doutorado) – Departament de Sciences Economiques et de Gestion, Universite Lumiere Lyon 2, France.
- HOUILLON, Charles. **Embriologia**. São Paulo: Edgard Blücher, EDUSP, 1972. 160p.
- MILLER, Jonathan. **O princípio da vida**. Rio de Janeiro: Record, 1984. 12p.
- OLIVEIRA, José E. D., SANTOS, Avany C., WILSON, Eva D. **Nutrição básica**. São Paulo: Sarvier, 1982. 286p.
- NAKAMURA, S., KAORU, M., NARSING R., HERBERT A. W., BUDDI, R. Vascular endothelial growth factor is a potent angiogenic fator in AIDS - associated Kaposi's sarcoma - derived spindle cells. **J. Immunol.** v. 158, n.10, p.4992-5001, 1997.
- PAYNE, L. N., GILLESPIE, A. M., HOWES, K. Myeloid leukaemogenicity and transmission of the HPRS-103 strain of avian leukosis virus. **Leukemia**. v.6, n.11, p.1167-1176, Nov. 1992.
- SPEAKE, B. K., MURRAY, A. M.B., NOBLE, R. C. Transport and transformations of yolk lipidis during development of avian embryo. **Prog. Lipid Res.** V.37, n.1, p.1-32, 1998.
- RICHARDS, M.P. Trace mineral metabolism in the avian embryo. **Poult Sci.** v.76, n.1, p.152-164, Jan. 1997.

Anexo 2

Inhibition activity in the growth of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in freeze-dried chicken embryo eggs with different days of development

CAMPOS, C. M. T.^{*1}; HAMAD, A. J. S.^{*}; MENDES, S. D. C.^{*}; FRITZEN, C. B.^{*}; BARON, F.^{**}; THAPON, J-L^{**}

* Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC (CIF/CCS, CAL/CCA). Campus Universitário - Trindade. Caixa postal: 476. CEP: 88010-970. Florianópolis/SC – Brasil. Tel: (55) 48 3319350 - Fax: (55) 48 3319542.

E-mail: celinha@ccs.ufsc.br.

** École National Supérieure Agronomique (ENSA) – Département Agro-Alimentaire - Rennes – França.
1 - Contact.

ABSTRACT

This study was designed to investigate the growth potential of Salmonella enteritidis and Staphylococcus aureus in freeze-dried chicken embryo eggs. We observed that these eggs do not have mechanisms of resistance to Salmonella and Staphylococcus growth because inhibitory factors, like lysozyme and ovotransferrin enzymes, which are inside of the egg white, may have lost their activity during the sample process.

Key words: *Salmonella enteritidis, Staphylococcus aureus, chicken embryo eggs, mechanisms of resistance.*

INTRODUCTION

Since ancient times chicken embryo eggs, fertile eggs and unfertilized eggs have been used as food and in the treatment of diseases (Thapon & Bourgeois, 1994). Many researchers have shown the use of eggs as a vehicle of several nutrition programs and as a source of active substances for therapeutic and diagnostic uses (Stadelman, 1999).

The chicken embryo has been used in researches as formation pattern of the brain development, behavior, memory mechanism and other aspects of the psychic development, being also the most economical and practical system of the influenza virus cultivation for the production of vaccines. It was discovered that the influenza virus adapts and replicates itself in the liquids and chorioallantoic membrane cells of chicken embryo eggs (Hardy *et al.*, 1995; Speake *et al.*, 1998).

These same chicken embryo eggs have been empirically used by Brazilian Amazon area

inhabitants, in the treatment of serious pathologies of bacterial origin such as tuberculosis, but this has not been scientifically proved yet.

Nowadays, there are already foods which have stability against microorganisms due to certain substances that have bactericidal activity. The chicken eggs are such examples, as they have some structures (the shell, the shell membrane), egg white pH (9,3) and egg white proteins (lysozyme, avidin, ovotransferrin) that prevent microorganisms invasion (Jay, 2000). Some authors suggested that eggs recently laid and embryo eggs are usually sterile (Denis *et al.*, 1995).

Baron *et al.* (1997) observed that inhibitory factors, mainly proteins, that are contained in the egg, reduce the growth of *Salmonella enteritidis*. Among the proteins, ovotransferrin was the major one implicated in the inhibition because it forms stable complexes with metal ions, and thus deprives bacteria from iron. Iron is essential for the

microbial growth. Another protein, the lysozyme, also acts as an inhibitor of the microbial growth (Cogan *et al.*, 2001).

Other authors suggested that certain mechanisms such as the lack of free water required for the dissolution of nutrients, and the nonavailability of proper nutrients required for growth, are also involved. The high pH, the heterogeneous structure of proteins, and viscosity of egg may also have a strong relationship with the inhibition of the bacterial growth (Baron *et al.*, 1997).

In this sense, this experiment was designed to investigate the inhibitory potency of freeze-dried chicken embryo for the control or inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus*.

MATERIALS AND METHODS

Sample process

The chicken embryo eggs (*Gallus gallus domesticus* L.) were obtained from incubation of *Isabrown* hens fertile eggs, temperature: $39.0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, for a period of time of 0, 3, 5, 7, 9, and 11 days. The hens are bred in an intensive pastured poultry system, according to Salatin (1993).

The incubated eggs were opened aseptically in sterile plates for the removal of the shell and to verify the embryonic period. After that, the remaining content was homogenized, frozen and freeze-dried using a BagMixer (Interscience, France), a plate freezer (Frigostrella, Brazil) and an E-C Micromodulyo Freeze Dryer (E-C Apparatus, USA).

After that, the product was packed in 30g plastic flasks, sealed and labeled, to be called sample units.

Microbiology analysis

The microbiologic exams for *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in freeze-dried chicken embryo eggs were based on the methodology used by Baron *et al.* (1997):

Sample preparation:

Firstly, freeze-dried chicken embryo eggs were reconstituted to be used in analysis. The dry extract of the sample units is approximately 24%. Four aliquots (5 mL) of sample units from every incubation day were prepared. The randomized

choice of the sample units was guaranteed by the use of the aleatory numbers table (Vieira & Hoffmann, 1989).

The sterility test of the samples:

The sterility of the freeze-dried chicken embryo eggs was tested in the following way: 1 mL of each reconstituted egg of every day of incubation was plated out in tryptone soy agar - TSA (AES Company, Comburg, France). After incubation at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 hours, the CFU were counted. This procedure was repeated 4 times for each flask.

The culture preparation:

The strain of the *Salmonella enteritidis* (SF 9066.94) used in this study was obtained and identified by Sylvine Fremy (Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires, Paris, França).

The strain of the *Staphylococcus aureus* (Coq.1) used in this study was obtained and identified by Florence Baron (Laboratoire de Microbiologie, École Nationale Supérieure Agronomique, Rennes, França).

The strains were stored in cryobille, ceramic beads with cryopreservative solution (AES Company, Comburg, France) at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ and propagated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24-hour in tryptic soy broth - TSB (Biokar Diagnostics, Beauvais, France), before use. Serial decimal dilutions of the 24 hours culture were prepared to obtain a final inoculum of about 10^7 *Salmonella enteritidis* and 10^5 *Staphylococcus aureus* cells per mL in the flask. The inoculum rate was checked.

Inoculation:

The prepared culture (0.1 mL) was used into 4 aliquots of 5 mL of each reconstituted egg (0, 3, 5, 7, 9 and 11 day of incubation sample units). After the inoculation, the flasks were incubated in a bath at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 48 hours.

Enumeration of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus*:

To proceed to the counting of the number of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* cells, decimal dilutions of the inoculated tubes incubated to $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 48 hours were made till 10^{-7} . After that, 1 mL of the content of each one of these

dilutions was plated out in tryptone soy agar - TSA. After incubation at 37 °C for 24 hours, the CFU were counted.

RESULTS AND DISCUSSION

The growth of mesophilic bacteria was not observed in the sterility test of the samples, in all the 5 mL aliquots of each of the reconstituted eggs

(0, 3, 5, 7, 9 and 11 days of incubation sample units), after 24 hours of incubation in TSA at 37 °C, showing that no viable microorganism was present in the sample units used in this study.

Following that, an investigation was conducted to know if there were mechanisms of resistance to *Salmonella* and *Staphylococcus* growth in sample units.

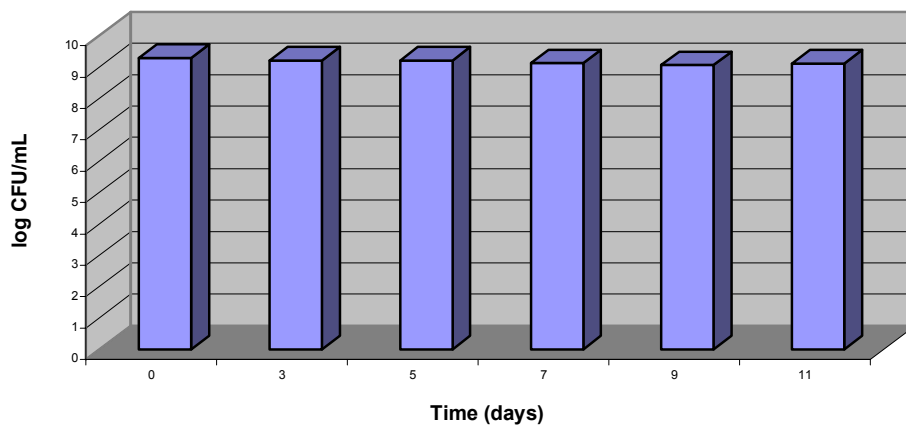


Figure 1: Growth of *Salmonella enteritidis* in freeze-dried chicken eggs with different days of development in TSA, after 48 hours of incubation at 30 °C. Initial inoculum 10⁷ CFU/ mL.

We can verify in Fig.1 that freeze-dried chicken embryo eggs did not have mechanisms of resistance to the *Salmonella* growth, because we observed that the final inoculum levels of

contamination were > 10⁷ cells of *Salmonella enteritidis* per mL in relation to the initial inoculum, indicating a widespread growth.

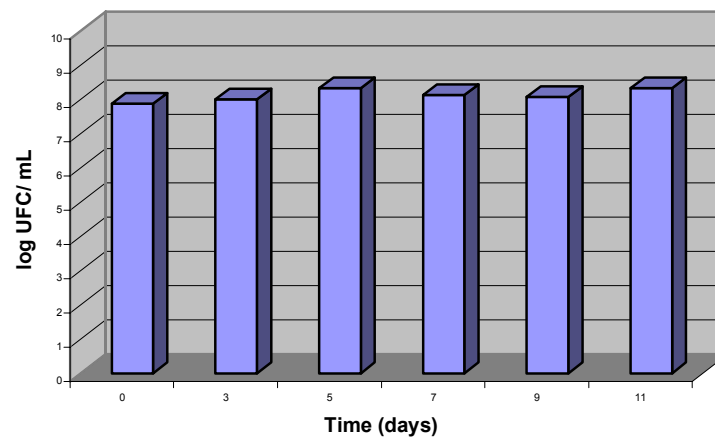


Figure 2: Growth of *Staphylococcus aureus* in freeze-dried chicken eggs with different days of development in TSA, after 48 hours of incubation at 30 °C. Initial inoculum 10^5 CFU/ mL.

We can verify in Fig.2 that freeze-dried chicken embryo eggs did not have mechanisms of resistance to the *Staphylococcus* growth either, because we observed that the final inoculum levels of contamination were $> 10^5$ cells of *Staphylococcus aureus* per mL in relation to the initial inoculum, indicating a widespread growth.

We can suggest an explanation for this phenomenon: lysozyme and ovotransferrin enzymes have lost their activity during freeze-drying and packaging. Cunningham *et al.* (2001) showed that the lysozyme enzyme can lose its activity when undergoing processing and/or when it is packaged in glass or polyethylene plastic flasks.

Also, in other studies, artificially contaminated eggs were used with *Salmonella sp* suspension in culture broth (Braun & Fehlhalber, 1995). Cogan *et al.* (2001) stated that the vitelin membrane of fresh eggs prevents the *Salmonella enteritidis* from invading the yolk. However, this membrane gradually deteriorates during the storage period (Humphred & Whitehead, 1993).

CONCLUSION

Freeze-dried chicken fertile eggs and freeze-dried chicken embryo eggs, used in this experiment, were in satisfactory sanitary conditions, but they do not have the mechanisms of resistance to the growth of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus*.

RESUMO

Estes artigos relatam o potencial de crescimento de *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus* em ovos de galinha embrionados e liofilizados. Verificou-se que os mesmos não apresentaram mecanismos de resistência ao crescimento de salmonela nem de estafilococos, pois as enzimas lisozima e ovotransferrina, que são inibidores do crescimento microbiano, presentes na clara de ovos, podem ter perdido sua atividade durante o processamento.

Palavras-chave: *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, ovos embrionados, mecanismos de resistência.

REFERENCES

- Baron, F., Gautier, M., Brule, G. (1997), Factors involved in the inhibition of growth of *Salmonella enteritidis* in liquid egg white. *Journal of Food Protection*, **60**, 1318-1323.
- Braun, P., Fehlhaber, K. (1995), Migration of *Salmonella enteritidis* from the albumen into the egg yolk. *International Journal Food Microbiology*, **25**, 95-99.
- Cogan, T. A., Domingue, G., Lappin-Scott, H. M.; Benson, C. E., Woodward, M. J., Humphrey, T. J. (2001), Growth of *Salmonella enteritidis* in artificially contaminated eggs: the effects of inoculum size and suspending media. *International Journal Food Microbiology*, **70**, 131-141.
- Cunningham, F. E., Proctor, V. A., Goetsh, S. J. (1991), Egg-white lysosyme as a food preservative. *World's Poultry Science*, **47**, 141-163.
- Denis, C., Protais, J., Corbion, B., Picoche, B., Colin, P., Lahellec, C., Pichon, P., Fremy, S., Boscher, E., Audiot, V. (1995), Thermorésistance de *Salmonella enteritidis* inoculée dans des ovoproduits: influence de l'activité de l'eau sur la thermorésistance. *Actualités Techniques et Industrielles*, 659-663.
- Humphrey T. J., Whitehead, A. (1993), Egg age and the growth of *Salmonella enteritidis* PT4 in egg contents. *Epidemiology and Infection*, **111**, 209-219.
- Hardy, C. T., Young, S. A., Webster, R. G., Naeve, C. W., Owens R. J. (1995), Egg fluids and cells of the chorioallantoic membrane of embryonated chicken eggs can select different variants of Influenza A (H3N2) viruses. *Virology*, **211**, 302-305.
- Jay, J. M. (2000), *Modern Food Microbiology*. 6 ed. An Aspen Publication, Maryland.
- Salatin, J. (1993), *Pastured poultry profits*. Polyface Swoope, Virginia.
- Speake, B. K., Murray, A. M. B., Noble, R. C. (1998), Transport and transformations of yolk lipids during development of avian embryo. *Progress in Lipid Research*, **37**, 1-32.
- Stadelman, W. J. (1999), Wold's poultry science association invited lecture: The incredibly functional egg. *Poultry Science*, **78**, 807-811.
- Thapon, J-L, Bourgeois C-M (1994), *L'oeuf et les ovoproduits*. Lavoisier - Technique et Documentation, Paris.
- Vieira, S., Hoffmann, R. (1989). *Estatística experimental*. Atlas, São Paulo.

Anexo 3

Aminoacids composition and protein profile in freeze-dried chicken embryo eggs with different periods of development

CAMPOS, C. M. T.^{*1}, HAMAD, A. J. S.^{*}, AMANTE, E. R.^{*}, THAPON, J-L^{**}, NAU, F.^{**}, CROGUENEC, T.^{**}, GUERIN-DUBIARD, C.^{**}, DRIF, A.^{**}

* Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC (CIF/CCS, CAL/CCA). Campus Universitário - Trindade. Caixa postal: 476. CEP: 88010-970. Florianópolis/SC – Brasil.

Tel: (55) 48 3319350 - Fax: (55) 48 3319542. E-mail: celinha@ccs.ufsc.br.

** École National Supérieure Agronomique (ENSA) – Département Agro-Alimentaire - Rennes – França.

1 - Contact.

ABSTRACT

This article presents aminoacids composition and protein profile in freeze-dried chicken embryo eggs with different development periods (0, 3, 5, 7, 9, 11 days). The protein profile was determined through HPLC-reverse phase, electrophoresis SDS-PAGE and IFE-electrophoresis. Differences found in aminoacids composition were not significant, except for aminoacid proline. Protein profile of these eggs changes according to the period of development and the change is more evident after 5th day, where there was an increase in ovalbumin, ovotransferrin, apoLDL, apoHDL and lysozyme concentration, and a decrease in ovomucin and ovostatin concentration. The hypothesis that the change in the protein profile is due to protein biosynthesis and disintegration that happens during incubation process is discussed.

Key words: *embryo eggs, aminoacids composition, protein profile.*

INTRODUCTION

Since ancient times chicken embryo eggs, fertile eggs and unfertilized eggs have been used by humanity as food and also in the treatment of diseases. From the nutrition point of view, eggs were always one of the most complete foods available for man (Thapon & Bourgeois, 1994). Besides vitamins and mineral elements eggs can provide three essential elements for a good diet: proteins, lipids and carbohydrates (Beig & Garcia, 1986). Many researchers have shown that eggs, besides being a source of several nutrients, can provide active substances for therapeutic and diagnostic uses (Stadelman, 1999).

The chicken embryo has been the object of research in the following aspects: brain development pattern, behavior and memory mechanism. The chicken embryo has been one of the most economical and practical systems to cultivate the influenza virus for the production of vaccines. It was found that influenza virus

adapts and replies itself in the liquids and chorioallantoic membrane cells of the chicken embryo eggs (Hardy *et al.*, 1995 ; Speake *et al.*, 1998). Chicken embryo eggs have also been used empirically by Brazilian Amazon area inhabitants, in the treatment of serious pathologies of bacterial origin as the tuberculosis.

We know that there are more than 40 proteins in the egg. Some egg white proteins are enzymes and others are nutrients. The main egg white proteins have been studied in details: Ovalbumin is the most abundant of white egg proteins (Stevens, 1991). Although no biological function has been identified to ovalbumin it supposedly has a role in nutrition as well as participation in the immune and allergic (to humans) properties of the egg white. Ovalbumin has foaming and gelling properties (Awandé *et al.*, 1994).

Ovotransferrin is also known as conalbumin and represents 13% of egg white proteins. It has

two functions: to transport iron to storage cells and protect the embryo from bacterial infections (Awandé *et al.*, 1994; Croguennec *et al.*, 1999). This protein can inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* (Croguennec *et al.*, 1999).

Ovomucin represents 1,5% of the total of egg white and has high viscosity (Stevens, 1991; Awandé *et al.*, 1994). Ovomucin is rich in sialic acid, which is an antiviral active substance (Thapon, 1981; Kato *et al.*, 1987; Croguennec, 2000).

Ovomucoid, ovoinhibitor, cystatin and ovostatin play a role against bacterial proteinases (Stevens, 1991). Avidin is the most studied of the vitamin binding proteins. Avidin is responsible for the nutritional human syndrome caused by consuming uncooked egg white (Stevens, 1991).

Ovoglobulins were originally divided into three classes G1, G2 and G3. Ovoglobulin G1 is known as lysozyme and its role is to protect the embryo against bacterial invasion. G2 and G3 do not have catalytic activity (Stevens, 1991).

In the vitelline membrane of the egg white we find lysozyme (De Boeck & Stockx, 1986). Lysozyme (mucoprotein N-acetylmuramoylhydrolase, EC 3.2.1.17) is an enzyme, which has the capacity to hydrolyze certain bacteria by the β -linkage between muramic acid and N-acetylglucosamine of mucopolysaccharides in the bacterial cell wall. Lysozyme also has the capacity to inactivate certain viruses by forming with acids an insoluble complex (Thapon, 1981; Li-Chan, 1986). Lysozyme has a great potential in human clinical applications in the treatments of ulcers, infections, and as a potentiator of some antibiotics (Li-Chan, 1986). Its action on embryo eggs is unclear but it is supposed to serve as a defense mechanism until the embryo has reached the capacity to produce immunoglobulins (7 days before hatching) (Kijowski, 1999). Lysozyme has considerable pharmaceutical interest because of its lytical activity against microorganisms (Guerin, 1991).

The yolk provides a very rich food for the embryo. Biochemical activities or proteins with interesting biochemical functions are absent from egg yolk or are present at very low concentrations, with the main exception of phosvitin, which has high phosphorus content. Phosvitin has an antithrombin action (Abe *et al.*,

1982). Phosvitin is a thick emulsion with a high proportion of lipids and lipoproteins. Vitellogenin is the major yolk protein, which is a nutritional source for the development of the embryo. Phosvitin was recently reported to be an ion-carrier and be an effective antioxidant (Kuksis, 1992).

Because of eggs' proteins have a potential application in the development of a new class of drugs, this work was designed to evaluate the aminoacids composition and protein characterization in freeze-dried chicken embryo eggs with different periods of development to know if there are some differences between then.

MATERIAL AND METHODS

Preparation of sample units

Chicken embryo eggs (*Gallus gallus domesticus* L.) were obtained from *Isabrown* fertile eggs, incubated at $39,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, for a period of 0, 3, 5, 7, 9, and 11 days. The *Isabrown* hens were bred in intensive outdoor raise system, according to Salatin (1993).

The shell of incubated eggs was removed aseptically in sterile plates and the stage of development of the embryo was verified. The remaining content was homogenized, frozen and freeze-dried using a BagMixer (Interscience, France), a plate freezer (Frigostrella, Brazil) and E-C Micromodulyo Freeze Dryer (E-C Apparatus, USA). The freeze-dried product was packed in 30g plastic flasks, sealed and labeled.

Samples of the flasks were selected for analysis using random numbers (Vieira & Hoffmann, 1989).

Aminoacids composition

Total aminoacids composition of each sample was determined according to Spackman *et al.* (1958), using Pharmacia-LKB analyzer (Alpha Plus, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Orsay, France). Two mg of the content of each flask were hydrolyzed in HCl 6N for 24 hours at $110\text{ }^{\circ}\text{C}$. In order to determine cysteine and methionine residues, samples units were first subjected to a performic acid oxidation and then hydrolyzed at $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ with HCl 6N (Moore, 1963).

Protein profile by HPLC – reverse phase

Protein characterization in freeze-dried chicken embryo eggs with different periods of development was determined by HPLC– reverse phase according to Nau *et al.* (1999), using a chromatograph Spectra-physics (Fremont, California, USA), equipped with an inert pump for binary gradients model Spectra SERIES P200, with a valve of manual injection, 200 μ L inert injector and helium as carrier gas (He). Detection was carried out at 280 nm with absorption UV/Vis detector, model Spectra SERIES UV 100. The chromatograms were processed with Azur v2.0 (1999 – 2001) in Windows software.

Reverse-phase (RP) chromatography was performed on a Vydac protein C4 column (Touzart & Matignon, Les Ulis, France). Reagents: trifluoroacetic acid (TFA) (Sigma, Steinheim, Germany) and HPLC-grade acetonitrile (ACN) (Carbo Erba Reagenti, Rodano, Italy). The linear gradient elution was made using water–acetonitrile 0.025% TFA, at a flow-rate of 0.8 mL/min.

Sample units of freeze-dried chicken embryo eggs were re-hydrated with water purified by Milli-Q System (0.08 g of powder for 10 mL of water) (Millipore, Molsheim, France), centrifuged and the supernatant was filtered through a 0.20 μ m membrane before injection in chromatograph. Liquid egg white supernatant (200 μ L) was processed as a control.

The identification of proteins HPLC–RP was made through the comparison of their retention times with those of proteins from liquid egg white supernatant.

Protein profile by SDS-PAGE electrophoresis

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed according to Laemmli (1970), using a 15% acrylamide separating gel containing 0.1% of SDS. Solution (40 μ L) from sample units of embryo eggs with different development days at 2.5 μ g/ μ L was used. Electrophoresis was carried out at constant current (150 V) for 45 min in a TRIS-glycine buffer pH 8.3 containing 0.5%

SDS. The gel sheet was stained for proteins by using the Coomassie blue method (Tunon & Johansson, 1984).

Protein profile by isoelectric focusing electrophoresis – IFE

Isoelectric focusing electrophoresis (IFE) was conducted according to Desert *et al.* (2001), using a 7.5% acrylamide gel and 3-7 anfolites. 5 μ L and 10 μ L of solution from samples units of freeze-dried embryo eggs with different periods were used corresponding to 10 and 20 μ g of protein, respectively. Electrophoresis was carried out at 100V (amperage 9 mA) during 1 hour, 250 V (amperage 20 mA) during 2 hours and 30 minutes and at 500 V (amperage 9 mA) during 2 hours and 30 minutes. Migration buffer was cathode: lysine 20 mM–arginine 20 mM, and anode: H₃PO₄ 10 mM. After migration, the gel sheet was stained for protein using silver staining method.

RESULTS AND DISCUSSION

Aminoacids composition in freeze-dried chicken embryo eggs with different incubation periods could be observed at Table 1. There are not significant differences in aminoacids composition except for proline.

We also verify that embryo eggs with different development periods of development can be a source of essential aminoacids such as threonine, valine, methionine, isoleucine, phenylalanine, histidine, and arginine

Parkinson (1972) also verified that relative abundance of different types of aminoacids is similar for almost all types of egg protein.

It is suggested that the increase of proline starting at the 9th day of development could be caused by the fact that this amino acid is involved with tissue formation. It is remarkable that proline biosynthesis is done through conversion of glutamate (Voet & Voet, 1995).

Table 1: Average of aminoacids composition (%) in sample units (30 g) of freeze-dried chicken embryo eggs (*Gallus gallus domesticus* L.) with different incubation periods.

AA/days	0	3	5	7	9	11
Asp	46,0	51,2	43,0	49,6	53,2	51,9
Thr	21,7	24,6	22,2	26,2	24,7	22,4
Ser	32,5	34,8	31,2	34,2	36,6	33,5
Glu	59,3	74,0	55,1	60,5	62,5	61,4
Pro	12,6	9,4	8,0	9,9	15,8	19,1
Gly	16,8	18,5	15,1	18,7	15,1	14,5
Ala	26,0	29,2	23,5	24,9	23,1	24,6
Cys	10,9	11,9	11,3	14,9	12,8	13,8
Val	26,8	30,8	29,0	31,4	24,5	25,3
Met	15,0	16,7	19,6	18,3	14,8	16,0
Ile	21,1	23,8	19,0	24,4	21,2	19,5
Leu	36,7	31,6	35,6	42,4	30,8	30,7
Tyr	19,3	25,2	20,0	26,1	21,7	23,2
Phe	31,0	35,9	29,7	36,7	27,1	25,3
His	11,1	11,8	9,0	9,5	11,2	11,4
Lys	28,0	31,7	25,2	27,1	30,4	32,1
NH3	7,0	7,2	5,8	6,0	6,6	6,3
Arg	28,4	30,9	30,4	28,7	31,6	29,6

Protein concentration of embryo eggs changes according to development time, and this variation is more expressive since 5th day

because of protein biosynthesis and disintegration that happens during incubation process (Figure 1).

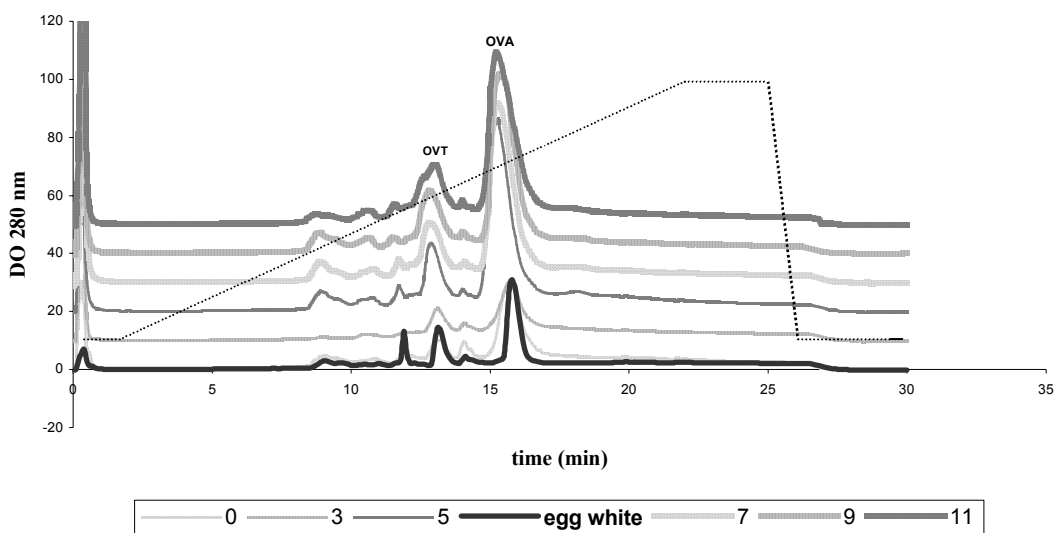


Figure 1: RP-HPLC chromatogram of freeze-dried chicken embryo eggs proteins with different incubation days.

Conditions: sample units of embryo eggs were re-hydrated in H₂O Milli-Q, dil ½, egg white liq dil 250 as pattern; column: Vydac protein C4; elution with water-acetonitrile 0.025% TFA (dashed lines indicate the concentration of acetonitrile in the phase); flow rate: 0.8 ml/min; detection: 280 nm.

Due to the graphic line have been put upon, 10 points were added in DO (ordinates axis), for every incubation day (starting from 3rd day), for a better visualization of the chromatogram.

The two highest peaks, identified as OVT and OVA, correspond to ovotransferrin and ovoalbumin proteins, respectively, because their retention times are coincident with those in liquid egg white.

The peak marked with OVA, corresponds to that found by Croguennec *et al.* (2000), where pure ovoalbumin was eluted with a retention time of about 15 minutes in RP-HPLC using a Vydac protein C4 column.

According to Nau *et al.* (1999), ovoalbumin peaks have several contaminants in low quantities, such as ovomucoid, ovoglobulin, cystatin, ovoflavoprotein, because these proteins have pI values that are very close to that of ovoalbumin.

Protein profile analysis by SDS-PAGE electrophoresis of samples units from in freeze-dried chicken embryo eggs with different incubation days were compared with egg white liquid, with yolk liquid and with markers of molecular weight (Figure 2).

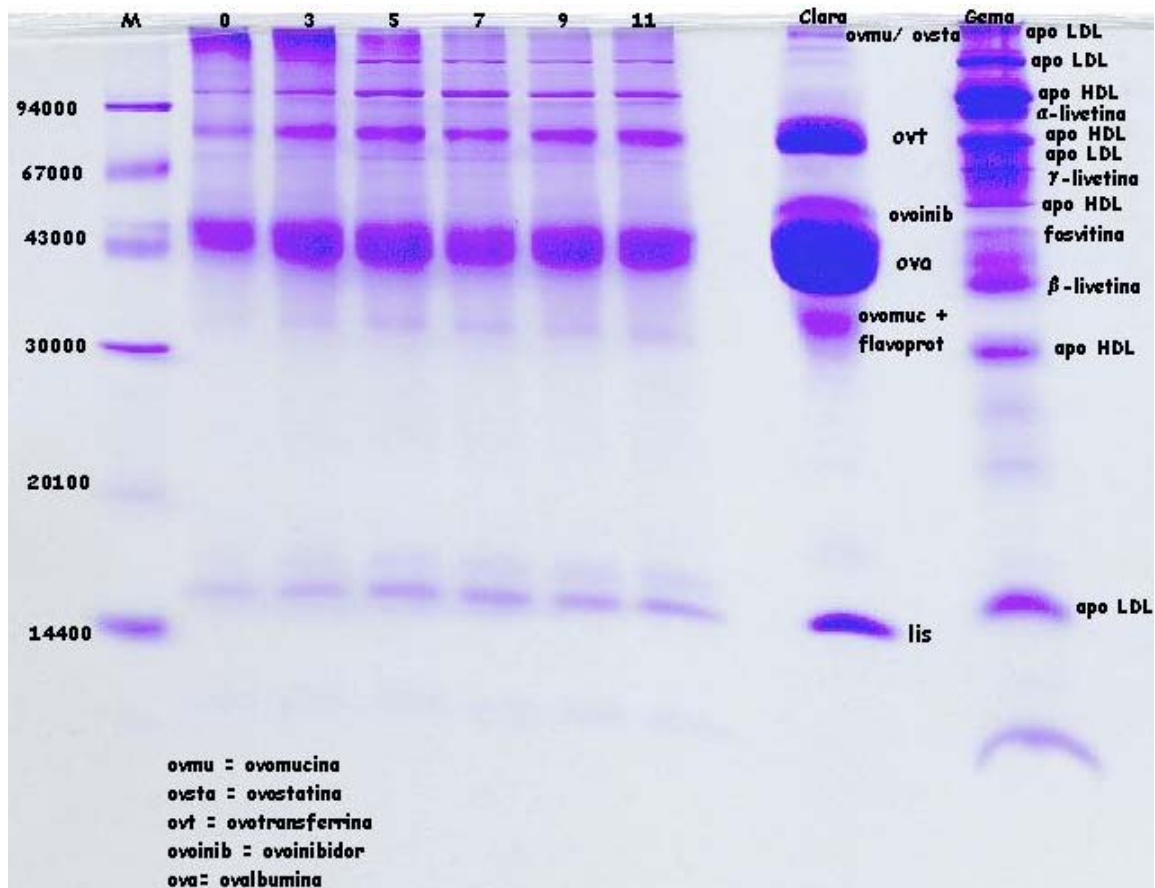


Figure 2: Characterization of proteins in freeze-dried chicken embryo eggs with different incubation days by SDS-PAGE electrophoresis.

Coomasie blue staining method. Deposit: 40 μ l to 2.5 μ g/ μ l.

M= markers of molecular weight.

0, 3, 5, 7, 9 and 11 = embryo eggs with different development periods.

Figure 2 indicates that there are differences in protein characterization in freeze-dried chicken embryo eggs with different incubation days, and the difference was more evident following the 5th day of development, where there was an increase

in ovalbumin, ovotransferrin, apoLDL, apoHDL, lysozyme concentration and there was a decrease in ovomucin and ovostatin concentration.

Bands shown in Figure 2 correspond to protein fractions: ovomucin/ ovostatin, apoLDL, apoHDL,

α -livetin, ovotransferrin, apoLDL, ovoinhibitor, ovoalbumin, phosvitin, β -livetin, ovomucoid + flavoprotein, apoHDL and lysozyme, respectively. These bands are coincident with molecular weights published by Stevens (1991) and with data of Awandé *et al.* (1994) and Croguennec *et al.* (2000).

Figure 3 indicates that there are differences in protein characterization in freeze-dried chicken

embryo eggs with different incubation days. Observation of thick bands and other hardly visible bands for the same protein fractions indicates differences in concentration. Isoelectric focusing electrophoresis – IFE showed to be the most sensitive separation methodology to evidence concentration differences of protein fractions between fertile and embryo eggs at different periods of development.

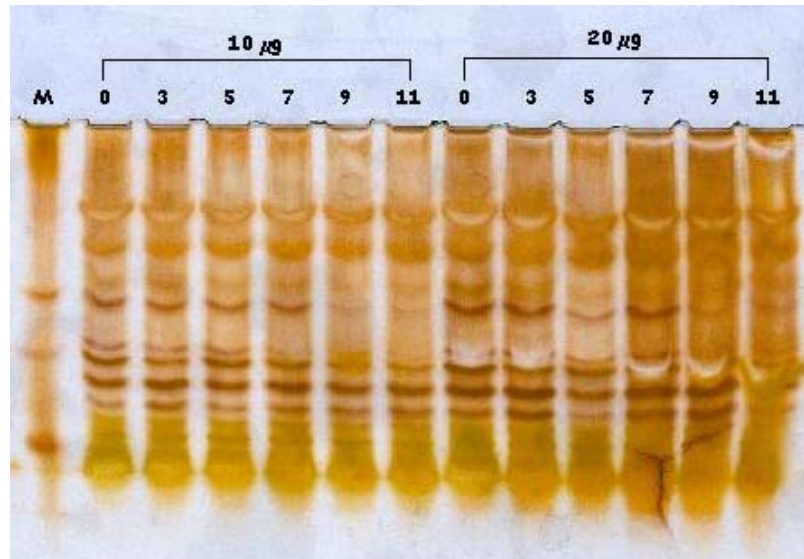


Figure 3: Characterization of freeze-dried chicken embryo eggs proteins with different development periods by IFE-electrophoresis (pH 3-7).

Silver staining method. Deposit: 10 μ l and 20 μ g of protein. migration parameters: 1 h (100 V), 2:30 h (250 V) and 2:30 h (500 V).

M= markers of pI.

0, 3, 5, 7, 9 and 11 = embryo eggs with different development periods.

Czuka *et al.* (1973) also found differences between protein profile with 7 incubation days embryo eggs and unfertile eggs in essays with others electrophoresis separation methods. These authors mention the occurrence of protein biosynthesis and disintegration during incubation process.

Concentration differences of protein fractions are more evident since 5th incubation because they are associated to the development of tissues and specific organs. According to

Noble & Cocchi (1990), at the 5th incubation day most of the organs and tissues can be identified and at the 10th day the embryo has its appearance recognized. It is remarkable that carbohydrate and proteins metabolism are predominant during two first weeks of chicken embryo development (Noble & Cocchi, 1990 e Speake *et al.*, 1998).

CONCLUSIONS

- There are no significant differences in aminoacids composition between freeze-dried chicken embryo eggs with different development periods, except for prolin
- Protein concentrations in embryonic eggs change through development time, and this variation is more expressive since the 5th day, when there was an increase in ovalbumin, ovotransferrin, apoLDL, apoHDL, and lysozyme concentration, and a decrease in ovomucin and ovostatin concentration, because of protein biosynthesis and disintegration that happens during the incubation process.
- Aminoacids and proteins from embryo eggs can be useful in human diet as sources of essential aminoacids such as threonine, valine, methionine, isoleucine, phenylalanine, histidine, and arginine. In addition to their traditional nutrient function, they can play a health restitutive role.

RESUMO

Este artigo mostra a composição de aminoácidos e perfil protéico em ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes períodos de desenvolvimento (0, 3, 5, 7, 9, 11 dias). O perfil protéico foi determinado por CLAE-fase reversa, eletroforese SDS-PAGE e eletroforese de focalização isoeletrica. Não foram verificadas diferenças na composição aminoacídica com exceção do aminoácido prolina. O perfil protéico destes ovos não é igual, sendo que a diferença fica mais evidente a partir do 5^o dia de desenvolvimento onde há um aumento da concentração das proteínas ovalbumina, ovotransferrina, apoLDL, apoHDL e lisozima, e diminuição da concentração da ovomucina e ovostatina, por estarem associadas ao desenvolvimento de tecidos e órgãos embrionários.

Palavras-chaves: ovos embrionados, composição de aminoácidos e perfil protéico.

REFERENCES

- Abe, Y., Itoh, T., Adachi, S. (1992), Fractionation and characterization of hen's egg yolk phosvitin. *Journal of Food Science*, **47**, 1903.
- Awandé, A. C., Moreau, S., Mollé, D., Brulé, G., Maubois, J-L. (1994), A two-step chromatographic procedure for purification of hen egg white ovomucin, lysozyme, ovotransferrin and ovalbumin, and characterization of purified proteins. *Journal of Chromatography*, **677**, 279-288.
- Beig, D., Garcia, F. C. M. (1998), *O embrião de galinha*. UFMS/ Imprensa Universitária, Campo Grande.
- Croguennec, T., Nau, F., Pezennec, S., Brulé, G. (1999), Chromatographic heterogeneity of ovotransferrin from hen egg white. Paper presented at VIII European Symposium on the Quality of Eggs and Eggs Products, Bologna, Itália. *Associazione Italiana di Avicoltura Scientifica, Istituto di Zootecnia*, **2**, 47-53.
- Croguennec, T., Nau, F., Pezennec, S., Brulé, G. (2000), Simple rapid procedure for preparation of large quantities of ovalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 4883-4889.
- Czuka, J., Novy, J., Jirosová, Z. (1973), Electrophoretic study of incubated infertile eggs. *Poultry Science*, **14**, 203-204.
- De Boeck, S., Stockx, J. (1986), Egg white lysozyme is the major protein of the hen's egg vitelline membrane. *International Journal Biochemistry*, **18**, 617-622.
- Desert, C., Guérin-Dubiard, C., Nau, F.; Jan, G., VAL, F., Mallard, J. (2001), Comparison of different electrophoretic separations of hen egg white proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 4553-4561.
- Guerin, C. (1991), Fractionnement et hydrolyse enzymatique de proteines du blanc d'oeuf. *Tese (Mention: Sciences Chimiques)* – Université de Rennes I, Rennes, France.
- Hardy, C. T., Young, S. A., Webster, R. G., Naeve, C. W., Owens R. J. (1995), Egg fluids and cells of the chorioallantoic membrane of embryonated chicken eggs can select different variants of Influenza A (H3N2) viruses. *Virology*, **211**, 302-305.
- Kato, A., Miyachi, N., Matsudomi, N., Kabayashi, K. (1987), The role of sialic acid in functional properties of ovomucin. *Agricultural Biological Chemistry*, **51**, 641-645.

- Kijowski, J., Lesnierowski, G., Fabiszkiowska, A. (1999), Isolation of egg white lysozyme, enzyme polymeric forms and its antibacterial activity. Paper presented at VIII European Symposium on the Quality of Eggs and Eggs Products, Bologna, Itália. *Associazione Italiana di Avicoltura Scientifica, Istituto di Zootecnia*, **2**, 361-371.
- Kuksis, A. (1992), Yolk Lipids. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1124**, 205-222.
- Laemmli, U. K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Li-Chan, E., Nakai, S., Sim, J., Bragg, D. B., Lo, K.V. (1986), Lysozyme separation from egg white by cation exchange column chromatography. *Journal of Food Science*, **51**.
- Nau, F., Mallard, A., Pages, J., Brulé, G. (1999), Reversed-phase liquid chromatography of egg white proteins: optimization of ovalbumin elution. *Journal of Liquid Chromatography & Rel. Technology*, **22**, 1129-1147.
- Noble, R. C., Cocchi, M. (1990), Lipid metabolism and the neonatal chicken. *Progress Lipid Research*, **29**, 107-140.
- Parkinson, T. L. (1972), Separation of the proteins of egg white and egg yolk and a study of their interactions in whole egg. *Journal Science Food Agriculture*, **23**, 665-670.
- Salatin, Joel (1993), *Pastured poultry profits*. Virginia (USA): Polyface Swoope.
- Spackman, D. H., Stein, W. H., Moore, S. (1958), Automatic recording apparatus for use in chromatography of amino-acids. *Analytical Chemistry*, **30**, 1190-1206.
- Speake, B. K., Murray, A. M. B., Noble, R. C. (1998), Transport and transformations of yolk lipids during development of avian embryo. *Progress Lipid Research*, **37**, 1-32.
- Stadelman, W. J. (1999), Wold's poultry science association invited lecture: The incredibly functional egg. *Poultry Science*, **78**, 807-811.
- Stevens, Lewis (1991), Mini-review: Egg white proteins. *Compendium Biochemistry Physiologic*, **100B**, 1-9.
- Thapon, J-L (1981), Effets de divers facteurs sur les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles du blanc d'oeuf. *Tese (Titre de Docteur-Ingenieur en Sciences Agronomiques - Spécialité: Productions Animales et Technologie des Produits Animaux) - L'École Nationale Supérieure Agronomique de Rennes en association avec l' Université de Rennes I, Rennes, France*.
- Thapon, J-L, Bourgeois C-M (1994), *L'oeuf et les ovoproduits*. Paris (France): Lavoisier -Technique et Documentation.
- Tunon, P., Johansson, K. E. (1984), Yet another improved silver staining method for detection of proteins in polyacrylamide gels. *Journal Biochemistry Biophysics Methods*, **9**, 171-179.
- Vieira, S., Hoffmann, R. (1989), *Estatística experimental*. São Paulo: Atlas.
- Voet, D., Voet, J. (1995), *Biochemistry*. 2. ed. New York (USA): John Wiley & Sons.

Anexo 4

Fatty acids ω -3 and ω -6 composition in freeze-dried chicken embryo eggs with different days of development

CAMPOS, C. M. T.^{1*}; HAMAD, A. J. S.¹; BLOCK, J. M.¹; PADILHA, J. C. F.¹; OGLIARI, P. J.¹; BARRERA-ARELLANO, D.²; MOREIRA, R. N. C.²

1 – Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC (CIF/CCS, CAL/CCA, ZOT/CCA, INE/CTC).

Campus Universitário - Trindade. Caixa postal: 476 – CEP: 88010-970. Florianópolis/SC – Brasil.

Tel: (55) 48 3319350 - Fax: (55) 48 3319542. E-mail: celinha@ccs.ufsc.br.

2 – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) – FEA/ Lab. Óleos e Gorduras - Campinas/SP – Brasil.

* Author for correspondence

ABSTRACT

In the present work, fatty acids ω -3 and ω -6 composition and specially DHA were determined in freeze-dried chicken embryo eggs with pre-determined incubation periods. According with the obtained results, fertile and embryo eggs presented the following averages composition of saturated fatty acids: palmitic ($23,18 \pm 0,54\%$) and stearic ($7,70 \pm 0,28\%$); unsaturated: palmitoleic ($3,00 \pm 0,19\%$), oleic ($36,28 \pm 0,58\%$), linoleic ($22,18 \pm 0,34\%$), linolenic ($1,08 \pm 0,04\%$), arachidonic ($2,04 \pm 0,03\%$) and docosahexaenoic ($0,91 \pm 0,03\%$); total of acids ω -3 ($2,26 \pm 0,10\%$) and total of acids ω -6 ($24,62 \pm 0,33\%$). We verify that there are no significant differences in total medium contents of fatty acids ω -3 ($p=0,1226$) between freeze-dried chicken embryo eggs with different incubation periods (3, 5, 7, 9, and 11 days) and fertile freeze-dried chicken eggs (day 0). However, there are significant differences in total medium contents of fatty acids ω -6 ($p=0,0001$). There is also a strong statistical evidence that quadratic model is related with expected values of DHA content ($p= 0,0013$).

Key words: chicken embryo eggs, fatty acids ω -3 and ω -6, DHA.

INTRODUCTION

Since ancient times chicken embryo eggs, fertile eggs and unfertilized eggs have been used by humanity as food and also in the treatment of diseases. From the nutrition point of view, eggs were always one of the most complete foods available for man (Thapon and Bougeois, 1994). Besides vitamins and mineral elements, eggs can provide three essential elements for a good diet: proteins, lipids and carbohydrates (Beig and Garcia, 1986). We must take in to account that eggs were not created for human being feed, but for generating a new life, therefore, that is the reason of being so complete and nutritive food.

Actually, cardiovascular diseases in occidental populations have increased and, consequently, caused an increase in people's

interest for foods that have the capacity of preventing these pathologies. Polyunsaturated fatty acids, mainly those of ω -3 family, such as docosahexaenoic (DHA), have a very important role in these diseases prevention, because of its property of decreasing the blood pressure and being a reducer of rates of blood plasma's triglycerides (Park *et al.*, 1997). According to Connor (2000) there is a strong evidence of inverse relation between quantity of fatty acids ω -3 in diet, blood and tissues, and coronary diseases and their complications. Other effects attributed to fatty acids ω -3 include an increase of memory capacity, visual development, and formation of cerebral tissue (Park *et al.*, 1997). Nettleton (1995) says that fatty acids ω -3 family have shown therapeutic effects also in diabetes

Type II. They offer a benefic potential effect because they reduce the triglycerides rates and, interrelation between glucose and lipid oxidation which act on prostaglandins and insulin secretion.

Fatty acids ω -3, therefore, are considered benefic and researches have been trying to increase their quantity in food, specially eicosapentaenoic (EPA), or docosapentaenoic (DPA) and docosahexaenoic (DHA) (Stadelman and Pratt, 1989). Ferrier *et al.* (1995) mention that eating eggs enriched with fatty acids ω -3 produces significant increase in docosahexaenoic acid (DHA) concentration and other fatty acids polyunsaturated ω -3 in phospholipid fraction of human blood.

Lin *et al.* (1991) recommend including ω -3 and ω -6 in formulas for children. They point out that when only α -linolenic acid is present in diet, it could be deficient in the reserves of DHA in the brain and the retina. Actually, Health and Welfare Canada (1990) in Ferrier *et al.* (1995) recommend to ingest ω -3 fatty acids daily for all ages people, in 1.1 g/day for women and 1.5 g/day α -linolenic acid for men. It is remarkable that fatty acids ω -3 are essential in human pregnancy and childhood. DHA is transferred to fetus by the placenta during pregnancy and it is present in human milk along with other fatty acids ω -3 including α -linolenic (Connor, 2000).

Embryo chicken eggs could be a natural source of ω -3 fatty acids, mainly of DHA, because several studies have demonstrated that embryo's fatty acids and lipids composition is completely different from original yolk, from which embryo is derived (Speake *et al.*, 1998).

MATERIALS AND METHODS

Preparation of sample units

Chicken embryo eggs (*Gallus gallus domesticus* L.) were obtained from *Isabrown* fertile eggs, incubated at $39,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, for a period of 0, 3, 5, 7, 9, and 11 days. The *Isabrown* hens were bred in intensive outdoor raise system, according to Salatin (1993).

The shell of incubated eggs was removed aseptically in sterile plates and the stage of development of the embryo was verified. The remaining content was homogenized, frozen and freeze-dried using a BagMixer (Interscience, France), a plate freezer (Frigostrella, Brazil) and Micromodulyo Freeze Dryer (Edwards, E-C Apparatus, USA). The freeze-dried product was packed in 30g plastic flasks, sealed and labeled. Samples of the flasks were selected for analysis using random numbers (Vieira and Hoffmann, 1989).

Fatty acids composition

Fatty acids were determined by gas chromatography – CG, according to official method of AOCS (Ce 1f – 96) adapted by Abril & Barclay (1999), in which fatty acids are identified by comparison of pattern retention times and quantified by areas standardization, using a gas chromatograph (Perkin Elmer 8420) and a capillary silica column (CP-Sil-88, N° 985132, 50 m x 0,25 mm).

Statistical design

For analyzing the statistics data it was applied variance analysis with contrasts and regression analysis using software Statistica for Windows version 5.1 and SAS System for Windows version 6.12.

RESULTS AND DISCUSSION

Fatty acids composition in freeze-dried chicken embryo eggs with different incubation periods could be observed at Table 1.

Table 1: Average of fatty acids composition in sample units of freeze-dried chicken embryo eggs (*Gallus gallus domesticus* L.) with different incubation periods.

Fatty acids (%)		0	3	5	7	9	11
C14:0	Miristic	0,32	0,30	0,36	0,32	0,32	0,27
C16:0	Palmitic	23,91	23,11	23,11	23,27	22,27	23,43
C16:1	Palmitoleic	3,00	3,02	3,19	3,00	3,14	2,64
C18:0	Stearic	7,66	7,87	7,37	7,77	7,43	8,12
C18:1	Oleic (ω - 9)	35,78	36,59	35,68	36,13	37,25	36,26
C18:2	Linoleic (ω - 6)	21,90	22,14	22,71	22,13	22,39	21,78
C18:3	Linolenic (ω - 3)	1,11	1,01	1,09	1,10	1,11	1,05
C20:3	Eicosatrienoic (ω - 6)	0,45	0,40	0,41	0,38	0,37	0,40
C22:0	Behenic	0,26	0,25	0,27	0,28	0,27	0,26
C20:4	Arachidonic (ω - 6)	2,02	2,09	2,04	2,05	2,00	2,05
C22:5	Docosapentaenoic (ω - 3)	0,22	0,16	0,37	0,30	0,30	0,30
C22:6	DHA (ω - 3)	0,95	0,89	0,86	0,90	0,91	0,94
Total of acids ω -3		2,28	2,06	2,32	2,30	2,32	2,29
Total of acids ω -6		24,37	24,63	25,16	24,56	24,76	24,23

Operating conditions: gas chromatograph - Perkin Elmer 8420; capillary silica column - CP-Sil-88, N^o 985132, 50 m x 0,25 mm; oven temperature: 160 °C–10 min, 160-200 °C (4 °C/min), 200 °C–20 min; detector temperature: 300 °C; injector temperature: 270 °C; 1,0 μ L injection; helium carrier gas (He): 45 psi – gas flow 0,98mL/min; Split: 1:55.

At Table 1 it is verified that fertile and embryo eggs can be sources of saturated fatty acids: palmitic (average: $23,18 \pm 0,54\%$) and stearic (average: $7,70 \pm 0,28\%$); unsaturated: palmitoleic (average: $3,00 \pm 0,19\%$), oleic (average: $36,28 \pm 0,58\%$), linoleic (average: $22,18 \pm 0,34\%$), linolenic (average: $1,08 \pm 0,04\%$), arachidonic (average: $2,04 \pm 0,03\%$) and docosahexaenoic (average: $0,91 \pm 0,03\%$). This result meets with averages values found by Ferrier *et al.* (1995) for fatty acids composition in eggs used as control.

Bragagnolo and Turatti (1999) found DHA contents in “light eggs” (with reduced lipids and cholesterol and enriched with ω -3 acids) around 1,5%. Compared with these results, embryo eggs produced in this work, presented contents of 0,6% lower than enriched eggs available at market.

In Figure 1 we can see contents of fatty acids ω -3 and ω -6 according to incubation periods in freeze-dried chicken embryo eggs.

Obtained results indicated that fertile and embryo eggs can represent a source of polyunsaturated fatty acids, including fatty acids ω -3.

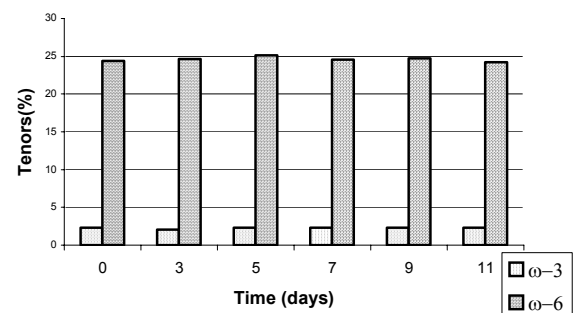


Figure 1: Content of fatty acids ω -3 and ω -6 versus development period in freeze-dried chicken embryo eggs.

In Table 2 we can observe the variance analysis with contrasts in which there are comparisons of total medium contents of fatty acids ω -3 and ω -6 in fertile eggs (day 0) with those in embryo eggs (3, 5, 7, 9, and 11).

Table 2: Variance analysis with contrasts of total content in fatty acids ω -3 and ω -6 in freeze-dried chicken embryo eggs with different incubation periods.

source of variation	F	p-value
linear	0,13	0,7347
quadratic	31,99	0,0013*

In Table 2 we verify that there are no significant differences in total medium contents of fatty acids ω -3 ($p=0,1226$), between freeze-dried chicken embryo eggs with different incubation periods (3, 5, 7, 9 and 11 days) and fertile freeze-dried chicken eggs (day 0). These embryo eggs present a medium content of these acids 0,022% less than fertile eggs. However, there are significant differences in total medium contents of fatty acids ω -6 ($p=0,0001$), between freeze-dried chicken embryo eggs with different incubation periods and freeze-dried fertile eggs. Embryo eggs present a medium content of these acids 0,294% more than fertile eggs.

Noble and Cocchi (1990) also verified that: there are changes in composition of fatty acids ω -6 and ω -9 during incubation process, the composition and distribution of fatty acids from triglycerides fraction in yolk and of yolk sac membrane remains unaltered and, there are expressive changes in cholesteryl ester fraction and phospholipids. Researches have shown that more than 90% of total energy required by embryo is supplied by β -oxidation of fatty acids derived from yolk lipids (Noble and Cocchi, 1990; Cherian and Sim, 1993 e Speake *et al.*, 1998). Maldjian *et al.*, (1995) mention that arachidonic acid ω -6 is relatively resistant to β -oxidation during the development of the chicken embryo. Cherian *et al.* (1997) also suggest that concentration of arachidonic acid and docosahexaenoic acid (DHA) are different during incubation. These acids present a pattern of transference of yolk to embryo different from others and they depend on supply from yolk.

Table 3 and Figure 2 represent regression analysis and scatter diagram of DHA content in freeze-dried chicken embryo eggs with different incubation periods.

Table 3: DHA content regression analysis in freeze-dried chicken embryo eggs with different incubation periods.

contrast	estimate	F	p-value
ω -3	- 0,022	3,23	0,1226
ω -6	0,294	617,40	0,0001*

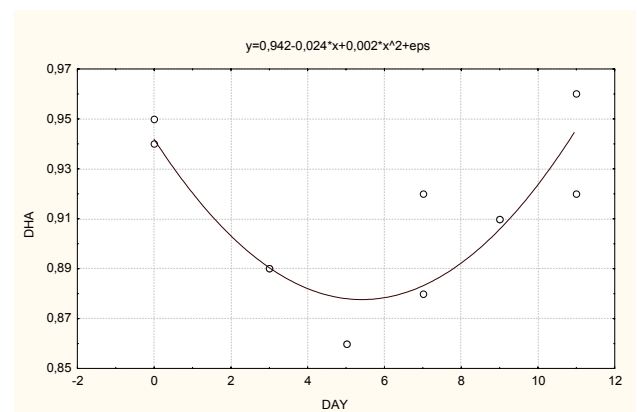


Figure 2: Scatter diagram of DHA medium content (%) in sample units of freeze-dried chicken embryo eggs with different incubation periods.

We can verify in Table 3 and Figure 2 that there is strong statistical evidence that quadratic model is related to expected values of DHA content ($p=0,0006$) and it originated the following equation:

$$\% \text{ DHA} = 0,942 - 0,02\text{days} + 0,0022 \text{ days}^2$$

A probable explanation for this model is that: at the 5th day of development, the phospholipids fractions which contain DHA are preferably removed from the yolk sack before the largest period of the embryo's growth.

In the 5th day of development the yolk sac is already complete and it surrounds the whole yolk. The yolk sack is one of the extra-embryo structures that has the function to remodel lipids structures related to the DHA contents. (Noble and Cocchi, 1990; Speake *et al.*, 1998).

Farkas *et al.* (1996) have shown that there is a preferential exit of phospholipids that contain DHA from the yolk to the membrane of this structure. There are also evidences, that inside the yolk sac membrane, DHA is changed from the phospholipids fractions of the yolk to lipoproteins triglycerides fractions that will become part of the embryo's circulation (Farkas *et al.*, 1996; Cherian *et al.*, 1997; Speake *et al.*, 1998).

Results allow to deduce that chicken embryo development among 0 and 11 days of incubation didn't change the medium totals contents of acids ω -3, but they changed the medium totals contents of acids ω -6. Starting from 5th day of incubation, the acid docosahexaenoic (DHA) is preferably removed from the yolk before the largest period of the embryo's growth, for being associated to the growth and the development of the tissues and organs of the nervous system. And so, fertile and embryo eggs can be useful in human diet as sources of long chain fatty acids ω -3 (DHA) ω -6 (arachidonic acid).

RESUMO

No presente trabalho, foi determinada a composição em ácidos graxos ω -3, ω -6 e, em especial, o DHA em ovos de galinha embrionados e liofilizados com períodos de incubação preestabelecidos. De acordo com os resultados obtidos, os ovos férteis e embrionados apresentaram a seguinte composição média de ácidos graxos saturados: palmítico ($23,18 \pm 0,54\%$) e esteárico ($7,70 \pm 0,28\%$); insaturados: palmitoléico ($3,00 \pm 0,19\%$), oléico ($36,28 \pm 0,58\%$), linoléico ($22,18 \pm 0,34\%$), linolênico ($1,08 \pm 0,04\%$), araquidônico ($2,04 \pm 0,03\%$) e DHA ($0,91 \pm 0,03\%$); total de ácidos ω -3 ($2,26 \pm 0,10\%$) e total ácidos ω -6 ($24,62 \pm 0,33\%$). Verifica-se que não há diferenças significativas nos teores médios totais de ácido graxos ω -3 ($p=0,1226$), entre os ovos embrionados liofilizados com diferentes dias de incubação (3, 5, 7, 9 e 11 dias) e ovos férteis liofilizados (dia 0). Porém, há diferenças significativas nos teores médios totais de ácidos graxos ω -6 ($p=0,0001$). Também, há uma forte evidência estatística que o

modelo quadrático está associado com os valores esperados do teor de DHA ($p=0,0013$).

Palavras-chave: ovos embrionados, ácidos graxos ω -3 e ω -6, DHA.

REFERENCES

- Abril, R. and Barclay, B. (1999), Fatty acid analysis of poultry eggs as methyl esters. *OmegaTech*. Bolder, Co. **Método OT-GCPE, Rev. 3.1**, 24/03/99.
- AOCS (1996), Official methods and recommended practices of de American Oil Chemists' Society. 4.ed. *American Oil Chemists' Society*, Champaign II.
- Bragagnolo, N. and Turatti, J. M. (1999), Evaluation of "light" eggs in Brazil. Paper presented at VIII European Symposium on the Quality of Eggs and Eggs Products, Bologna, Itália. *Associazione Italiana di Avicoltura Scientifica, Instituto di Zootechnia*, **2**, 177-181.
- Beig, D. and Garcia, F. C. M. (1986), O embrião de galinha. *UFMS/ Imprensa Universitária*, Campo Grande.
- Cherian, G. and SIM, J. S. (1993), Net transfer and incorporation of yolk n-3 fatty acids into developing chick embryos. *Poultry Science*, **72**, 98-105.
- Cherian, G.; Gopalakrishnan, N.; Akiba, Y. and Sim, J.S. (1997), Effect of maternal dietary n-3 fatty acids on the accretion of long-chain polyunsaturated fatty acids in the tissues of developing chick embryo. *Biology of Neonate*, **72**, 165-174.
- Connor, W. E. (2000), Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, **71**, 171S-175S. Suppl.
- Farkas, K.; Noble, R. C.; Speake, B. K (1996), Development changes in the levels of molecular species of triacylglycerol that contain docosahexaenoic acid in adipose tissue of chick embryo. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, **115**, 1-6.
- Ferrier, L. K.; Caston, L. J.; Leeson, S.; Squires, J.; Weaver, B. J. and Holub, B.J. (1995), α -linolenic acid – and docosahexaenoic acid – enriched eggs from hens fed flaxseed: influence on blood lipids and platelet phospholipid fatty acids in human. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **62**, 81-86.
- Lin, D.S.; Connor, W. E. and Anderson, G. J. (1991), The incorporation of n-3 and n-6 essential fatty acids into chicken embryo from eggs yolks having vastly different fatty acid compositions. *Pediatric Research*, **29**, 601-605.

- Maldjian, A.; Falkas, K.; Noble, R. C.; Cocchi, M. and Speake, B.K. (1995), The transfer of docosahexaenoic acid from the yolk to the tissues of chicken embryo. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1258**, 81-99.
- Nettleton, J. A. (1995), Omega-3 fatty acids and health. *Chapman & Hall*, New York.
- Noble, R. C. and Cocchi, M. (1990), Lipid metabolism and the neonatal chicken. *Prog. Lipid Res.*, **29**, 107-140.
- Park, Y. K; Koo, M. H. and Carvalho, P. O. (1997), Recentes Progressos dos Alimentos Funcionais. *Bol. SBCTA*, **31**.
- Salatin, J.(1993), Pastured poultry profits. *Polyface Swoope*, Virginia.
- Speake, B. K.; Murray, A. M. B. and Noble, R. C. (1998), Transport and transformations of yolk lipids during development of avian embryo. *Prog. Lipid Res.*, **37**, 1-32.
- Stadelman, W. J. and Pratt, D. E. (1989), Factors influencing composition the hen's egg. *World's Poultry Science Journal*, **45**, 247-261.
- Thapon, J-L and Bourgeois C-M. (1994), L'oeuf et les ovoproduits. *Lavoisier -Technique et Documentation*, Paris.
- Vieira, S. and Hoffmann, R. (1989), Estatística experimental. *Atlas*, São Paulo.

Anexo 5

DETERMINAÇÃO DOS ELEMENTOS MINERAIS (POTÁSSIO, SÓDIO, MAGNÉSIO E CÁLCIO) EM OVOS DE GALINHA EMBRIONADOS E LIOFILIZADOS COM DIFERENTES DIAS DE DESENVOLVIMENTO (Some mineral element contents (potassium, sodium, magnesium and calcium) in freeze-dried chicken embryo eggs with different days of development)

Célia Maria Teixeira de Campos¹, Antônio José Simões Hamad², José Carlos Fiad Padilha³, Françoise Nau⁴, Jean-Louis Thapon⁴

Resumo: No presente trabalho foi determinada a composição em elementos minerais (K, Na, Mg e Ca) em ovos de galinha embrionados e liofilizados com períodos de incubação pré-estabelecidos. De acordo com os resultados obtidos os ovos embrionados apresentaram a seguinte composição média total de elementos minerais: potássio ($7728,06 \pm 179,01$ ppm), sódio ($5217,62 \pm 194,19$ ppm), magnésio ($521,35 \pm 52,11$ ppm) e cálcio ($3019,43 \pm 130,58$ ppm). Os ovos embrionados podem ser, portanto, fonte destes minerais e podem contribuir para minimizar a carência dos mesmos na dieta humana.

Unitermos: ovos embrionados, elementos minerais (K, Na, Mg e Ca).

Abstract: In the present work some mineral elements contents (K, Na, Mg, and Ca) were determined in freeze-dried chicken embryo eggs with pre-determined incubation periods. According with the obtained results embryo eggs presented the following averages of mineral elements composition: K (7728.06 ± 179.01 ppm), Na (5217.62 ± 194.19 ppm), Mg (521.35 ± 52.11 ppm) and Ca (3019.43 ± 130.58 ppm). Obtained results indicated that embryo eggs represent a good source of these minerals and they can be useful in human diet.

Key words: chicken embryo eggs, potassium, sodium, magnesium, and calcium.

1 – Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos – UFSC. Professora do Departamento de Ciências Farmacêuticas/ CCS/ UFSC. E-mail: celinha@ccs.ufsc.br.

2 – Professor do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ CCA/ UFSC.

3 – Professor do Departamento de Zootecnia/ CCA/ UFSC.

4 – Professores da École National Supérieure Agronomique (ENSA) – Département Agro-Alimentaire - Rennes – França.

1 - Introdução

Desde a antiguidade, ovos de galinha não fecundados, férteis e embrionados, têm sido empregados como alimento e na terapia de doenças. Sob o ponto de vista nutritivo, os ovos sempre foram um dos alimentos mais completos e baratos que o homem teve à sua disposição¹¹. Dos três nutrientes imprescindíveis para uma boa dieta (proteínas, lipídios e carboidratos), os ovos contêm principalmente os dois primeiros, além de incluir vitaminas e elementos minerais¹. Ressalta-se que um ovo não foi concebido para ser alimento humano e sim para gerar uma nova vida. Portanto, eis a razão dele ser completo e ser um alimento altamente nutritivo.

Muitos pesquisadores têm relatado a utilização de ovos como veículo de vários nutrientes e como fonte de substâncias ativas para uso terapêutico e de diagnóstico⁸.

Os ovos embrionados vêm sendo utilizados, empiricamente, por habitantes da região amazônica brasileira no tratamento de patologias graves de origem bacteriana como a tuberculose, o que ainda não foi comprovado cientificamente. Visando estabelecer a existência de um fator que justifique o uso do ovo como auxiliar no tratamento dessas patologias, desenvolveram-se vários trabalhos de pesquisa com esta finalidade.

Os principais elementos minerais encontrados na clara dos ovos, como: o cálcio, o magnésio, o sódio, o potássio, o fósforo e o cloro¹⁰. Segundo Stibilj & Holcman⁹ o conteúdo da matéria seca da gema dos ovos é composta de 1,1% dos elementos minerais: fósforo, cálcio, potássio e traços dos outros elementos. O conteúdo dos minerais depende da dieta, das condições ambientais, da temperatura e da idade das galinhas.

Os dados da literatura não fazem referência à origem dos ovos, do tipo de ovos, do sistema de criação, do tamanho e do número de amostras analisadas⁹. Neste sentido, este trabalho pretende avaliar a quantidade dos elementos minerais (K, Na, Mg e Ca) em ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de desenvolvimento.

2 - Materiais e métodos

2.1 - Preparo das unidades amostrais

Os ovos embrionados de *Gallus gallus domesticus* L. foram obtidos através da incubação de ovos férteis de galinhas poedeiras comerciais da linhagem *Isa Brown*, criadas em sistemas intensivos de criação ao ar livre, segundo Salatin⁶, por um período de tempo de 0, 3, 5, 7, 9 e 11 dias, a temperatura de $39,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Os ovos incubados foram abertos assepticamente em placas estéreis, eliminando-se a casca para se verificar o estágio embrionário. Em seguida, fez-se a homogeneização, o congelamento e a liofilização do restante do conteúdo com o auxílio de um homogeneizador BagMixer (Interscience, França), de um congelador a placas (Frigostrella, Brasil) e de um liofilizador E-C Micromodulyo Freeze Dryer (E-C Apparatus, EUA).

Posteriormente, o produto obtido foi acondicionado em frascos de plástico com 30g, lacrado e rotulado, recebendo a denominação de unidade amostral.

2.2 - Teor dos elementos minerais:

Os teores dos elementos minerais potássio, sódio, magnésio e cálcio (K, Na, Mg e Ca) dos ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de desenvolvimento foi determinado segundo o protocolo de dosagem de minerais na clara do ovo, baseado na metodologia elaborada por Le Graët^{3,4}, utilizando um espectrofotômetro de absorção atômica de chama (Varian, SpectrAA 300, Paris, França), a um comprimento de onda de 766,5 nm para o potássio, 589 nm para o sódio, 285,2 para o magnésio e 422,7 nm para o cálcio, respectivamente. O aparelho é equipado com um queimador de ar-acetileno e lâmpadas de cátodo K-Na e Ca-Mg.

2.3 - Delineamento estatístico

A casualidade para a escolha das unidades amostrais que foram analisadas foi garantida pelo uso da tabela de números aleatórios¹². Para análise estatística dos dados foi aplicada a análise de variância com contrastes utilizando o software SAS System for Windows versão 6.12.

3 – Resultados e discussão

Os teores médios dos elementos minerais potássio, sódio, magnésio e cálcio (K, Na, Mg e Ca) em ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1: Média do teor dos minerais (ppm) em unidades amostrais de ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação.

Dias	Potássio (K)	Sódio (Na)	Magnésio (Mg)	Cálcio (Ca)
0 (fértil)	6490,987 \pm 159,5083	4527,87 \pm 13,9781	542,3500 \pm 4,82152	3009,513 \pm 154,6776
3	7719,807 \pm 158,9388	5112,24 \pm 8,5916	479,2500 \pm 6,14878	3058,463 \pm 150,5594
5	7774,350 \pm 116,5843	5032,18 \pm 11,7696	488,1600 \pm 6,89592	3053,257 \pm 157,7246
7	7448,827 \pm 128,5762	5177,61 \pm 20,3259	490,4233 \pm 7,56329	2824,290 \pm 142,4826
9	7945,876 \pm 100,8977	5539,58 \pm 12,6943	600,8267 \pm 7,05285	2980,597 \pm 150,7207
11	7751,463 \pm 91,5543	5226,48 \pm 5,3409	548,0767 \pm 7,24980	3180,527 \pm 154,0813

Verifica-se na Tabela 1 que os ovos embrionados (dias 3, 5, 7, 9 e 11) são fontes dos elementos minerais potássio (teor médio total de 7728,06 \pm 179,01 ppm), sódio (teor médio total de 5217,62 \pm 194,19 ppm), magnésio (teor médio total de 521,35 \pm 52,11 ppm) e cálcio (teor médio total de 3019,43 \pm 130,58 ppm). Este resultado confere aproximadamente com as médias encontradas por Stadelman & Cotterill⁷ para a composição de minerais em ovos inteiros.

Na Figura 1 podem ser observados os teores médios dos elementos minerais médios de K, Na, Mg e Ca de acordo com os dias de desenvolvimento em ovos de galinha embrionados e liofilizados. Os ovos embrionados, portanto, são fontes destes minerais e podem contribuir para diminuir suas carências na dieta humana.

Bello² menciona que a suplementação das dietas com minerais tem sido uma prática comum em muitos países, pois, muitos setores da população, incluindo os de países desenvolvidos, recebem uma alimentação deficiente em macrominerais, principalmente cálcio, ferro, zinco, magnésio, cromo, selênio e iodo. Uma suplementação de cálcio é particularmente importante para mulheres para evitar os efeitos nocivos da osteoporose pós-menopausa.

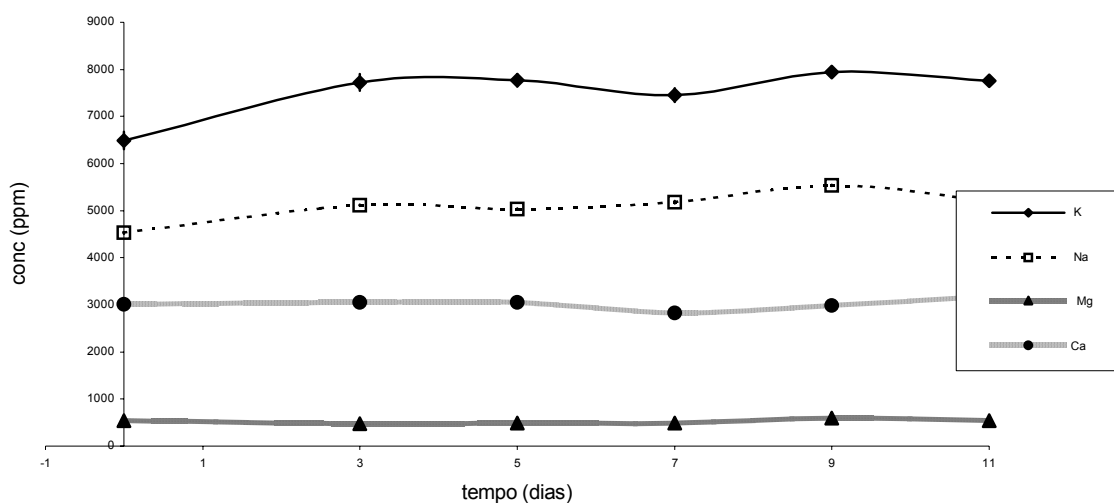


Figura 1: Teores médios dos elementos minerais versus dias de desenvolvimento em ovos de galinha embrionados e liofilizados.

Na Tabela 2 pode ser observada a análise de variância com contraste, onde foram comparados os teores médios dos minerais K, Na, Mg e Ca dos ovos férteis (dia 0) com os dos ovos embrionados (dias 3, 5, 7, 9 e 11).

Tabela 2: Análise de variância com contrastes dos teores médios dos minerais K, Na, Mg e Ca em ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação.

Contraste	Estimativa	F	Valor p
K	1237,08	230,96	0,0001*
Na	689,75	7061,94	0,0001*
Mg	-21,00	24,68	0,0003*
Ca	9,91	0,01	0,9195

Verifica-se na Tabela 2 que há diferenças significativas nos teores médios dos minerais potássio ($p=0,0001^*$), sódio ($p=0,0001^*$) e magnésio ($p=0,0003^*$) entre os ovos embrionados liofilizados com diferentes dias de incubação (dias 3, 5, 7, 9 e 11) e ovos férteis liofilizados (dia 0), sendo que os ovos embrionados apresentam uma média do teor de K 1237,08 ppm superior, de Na 689,75 ppm superior e de Mg 21,00 ppm inferior aos ovos férteis. Porém, não há diferença

significativa nos teores médios de cálcio entre os ovos embrionados liofilizados com diferentes dias de incubação e ovos férteis liofilizados (dia 0) ($p=0,9195$), sendo que os ovos embrionados apresentam uma média do teor de mineral 9,91 ppm superior aos ovos férteis.

Richards⁵ menciona que a membrana da gema é quem serve como sítio de armazenamento de minerais porque ela tem a função de regular o aporte de minerais durante o desenvolvimento do embrião.

4 - Conclusão

Os ovos embrionados são fontes dos minerais potássio, sódio, magnésio e cálcio, podendo contribuir para reduzir a carência desses na dieta humana pois, estes exercem funções fisiológicas além de atuarem como nutrientes.

5 – Referências bibliográficas

1. Beig, D., Garcia, F. C. M. **O embrião de galinha**. Campo Grande: UFMS/ Imprensa Universitária, 1986. 36p.
2. BELLO, J. Los alimentos funcionales nutraceuticos: 2. Funciones saludables de algunos componentes de los alimentos. **Alimentaria**, v.267, p.49-58, 1995.
3. LE GRAËT, Yvon. Méthode d'analyse chimique: MO-METHO 0017 (calcium et magnésium). Rennes (França): **Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)**, 22/11/99.
4. LE GRAËT, Yvon. Méthode d'analyse chimique: MO-METHO 0018 (potassium et sodium). Rennes (França): Institut National de la Recherche Agronomique (INRA-Rennes), 23/11/99.
5. RICHARDS, M. P. Trace mineral metabolism in avian embryo. **Poultry Science**, v. 76, n.1, p.152-164, 1997.
6. SALATIN, Joel. **Pastured poultry profits**. Virginia (USA): Polyface Swoope, 1993. 330p.
7. STADELMAN, W. J.; COTTERILL, O. J. (eds.) **Egg science and technology**. 3.ed. Westport (England): Avi, 1986. p. 345-383.
8. STADELMAN, W. J. Wold's poultry science association invited lecture: The incredibly functional egg. **Poultry Science**, n. 78, p.807-811, 1999.

9. STIBILJ, V.; HOLCMAN, A. Content of some minerals in the hens's eggs from free range. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON QUALITY OF EGGS AND EGGS PRODUCTS, 8, set., 1999, Bologna, Itália. **Anais da Associazione Italiana di Avicoltura Scientifica**. Bologna (Itália): Instituto di Zootecnia, set., 1999. v.2, p. 295-299.
10. THAPON, Jean-Louis. **Effets de divers facteurs sur les proprietes physico-chimiques et fonctionnelles du blanc d'oeuf**. Rennes, França, 1981. Tese (Titre de Docteur-Ingenieur en Sciences Agronomiques - Spécialité: Productions Animales et Technologie des Produits Animaux) - L'École Nationale Superieure Agronomique de Rennes en association avec l' Université de Rennes I.
11. THAPON, Jean-Louis; BOURGEOIS Claude-Marcel. **L'oeuf et les ovoproduits**. Paris (France): Lavoisier -Technique et Documentation, 1994. 344p.
12. VIEIRA, S., HOFFMANN, R. **Estatística experimental**. São Paulo: Atlas, 1989. 179p.

Anexo 6

DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE ÁCIDOS SIÁLICOS EM OVOS DE GALINHA EMBRIONADOS E LIOFILIZADOS COM DIFERENTES DIAS DE DESENVOLVIMENTO (Sialic acids contents in freeze-dried chicken embryo eggs with different days of development).

Célia Maria Teixeira de Campos¹, Antônio José Simões Hamad², Rodrigo Nogueira Giovanni³, José Carlos Fiad Padilha⁴, Paulo José Ogliari⁵, Françoise Nau⁶, Jean-Louis Thapon⁶

Resumo: No presente trabalho foi realizada a determinação dos ácidos siálicos em ovos de galinha embrionados e liofilizados com períodos de incubação preestabelecidos dada as potencialidades destes ácidos no desenvolvimento de uma nova classe de fármacos antivirais. De acordo com os resultados obtidos, os ovos férteis e embrionados apresentaram os seguintes teores dos ácidos siálicos: $628,61 \pm 29,72$ $\mu\text{moles}\%$ (dia 0), $638,38 \pm 4,11$ $\mu\text{moles}\%$ (dia 3), $642,86 \pm 32,73$ $\mu\text{moles}\%$ (dia 5), $480,83 \pm 39,72$ $\mu\text{moles}\%$ (dia 7), $530,37 \pm 18,67$ $\mu\text{moles}\%$ (dia 9) e $614,01 \pm 3,96$ $\mu\text{moles}\%$ (dia 11). Verificou-se, também, que há uma forte evidência estatística que o modelo cúbico está associado com os valores esperados dos teores dos ácidos siálicos ($p=0,0001$). Os ovos embrionados podem ser, portanto, fonte desses ácidos.

Unitermos: ovos embrionados, ácido siálico.

Abstract: The present work was designed to investigate sialic acids contents in freeze-dried chicken embryo eggs with predetermined incubation periods, because these acids have potential utility in developing a new class of antiviral drugs. According with the obtained results, fertile and embryo eggs presented the following medium tenor of sialic acids: 628.61 ± 29.72 $\mu\text{moles}\%$ (day 0), 638.38 ± 4.11 $\mu\text{moles}\%$ (day 3), 642.86 ± 32.73 $\mu\text{moles}\%$ (day 5), 480.83 ± 39.72 $\mu\text{moles}\%$ (day 7), 530.37 ± 18.67 $\mu\text{moles}\%$ (day 9) e 614.01 ± 3.96 $\mu\text{moles}\%$ (day 11). We verify, also, there is a strong statistical evidence that cubic model is related to expected values of sialic acids content ($p=0,0001$). Then, chicken embryo eggs could be source of these acids.

Key words: chicken embryo eggs, sialic acids.

1 – Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos – UFSC. Professora do Departamento de Ciências Farmacêuticas/ CCS/ UFSC. E-mail: celinha@ccs.ufsc.br.

2 – Professor do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ CCA/ UFSC.

3 – Engenheiro Agrônomo e mestre em Ciências dos Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ CCA/ UFSC.

4 – Professor do Departamento de Zootecnia/ CCA/ UFSC.

5 – Professor do Departamento de Informática e Estatística/ CTC/ UFSC.

6 – Professores da École National Supérieure Agronomique (ENSA) – Département Agro-Alimentaire - Rennes – França.

1 - Introdução

Desde a antiguidade, ovos de galinha não fecundados, férteis e embrionados, têm sido empregados como alimento e na terapia de doenças¹². Muitos pesquisadores têm relatado a utilização de ovos como veículo de vários nutrientes e como fonte de substâncias ativas para uso terapêutico e de diagnóstico¹¹.

O embrião de galinha tem sido utilizado em pesquisas como padrão de formação do desenvolvimento do cérebro, comportamento, mecanismo da memória e outros aspectos do desenvolvimento psíquico na embriogênese, além de ser o sistema mais econômico e prático de cultivo para a produção de vacinas contra o vírus da gripe. Foi descoberto que esse vírus se adapta e se replica nas células da membrana carioalantoínica e nos fluídos dos ovos embrionados de galinha^{3, 10}.

Esses mesmos ovos vêm sendo utilizados, empiricamente, por habitantes da região amazônica brasileira no tratamento de patologias graves de origem bacteriana como a tuberculose, o que ainda não foi comprovado cientificamente. Visando estabelecer a existência de um fator que justifique o uso do ovo como auxiliar no tratamento dessas patologias, desenvolveram-se vários trabalhos de pesquisa com esta finalidade.

Membros da família do ácido siálico ocorrem numa variedade de tecidos, fluidos orgânicos, bactérias (principalmente *E. coli*) e incorporados a proteínas conjugadas². Resultados de pesquisas têm demonstrando que o ácido siálico apresenta potencialidades de fornecer a base para uma nova classe de fármacos⁴. O ovo é uma fonte natural de ácidos siálicos os quais estão presentes na gema, membrana da gema e chalaza^{4, 9}.

Hartmann & Wilhelmson (2001) relatam que o vírus influenza (gripe), que é encontrado no trato respiratório de humanos, e o rotavírus são inibidos pelo ácido siálico. O rotavírus é o maior patógeno causador de gastroenterites em crianças, tanto em países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento¹¹.

Ácido siálico é um termo genérico para aproximadamente 40 derivados do ácido neuramínico o qual tem um grupamento acil no nitrogênio do grupo amino. O mais distribuído na natureza é o Neu5Ac^{4, 5}. O ácido N-acetilneuramínico (NANA) pertence à família dos açúcares aminados, contém 9 ou mais átomos de carbono (C₁₁H₁₉NO₃), apresenta peso molecular de 309,28 Da., com ampla distribuição no reino animal². Ele ocorre combinado com uma grande variedade de substâncias incluindo mucoproteínas, mucolipídios, oligossacarídeos e nucleotídios.

A clara do ovo contém diferentes mucoproteínas. Duas dessas, a ovomucóide e a ovomucina, apresentam ácido siálico¹.

Os ovos embrionados de galinha podem ser uma fonte natural de ácido siálico. Neste sentido, esse trabalho pretende avaliar a quantidade deste ácido em ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de desenvolvimento.

2 - Metodologia

2.1 - Preparo das unidades amostrais

Os ovos embrionados de *Gallus gallus domesticus* L. foram obtidos através da incubação de ovos férteis de galinhas poedeiras comerciais da linhagem *Isa Brown*, criadas em sistemas intensivos de criação ao ar livre, segundo Salatin (1993), por um período de tempo de 0, 3, 5, 7, 9, e 11 dias, à temperatura de $39,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Os ovos incubados foram abertos assepticamente em placas estéreis, eliminando-se a casca para se verificar o estágio embrionário. Em seguida, fez-se a homogeneização, o congelamento e a liofilização do restante do conteúdo com o auxílio de um homogeneizador BagMixer (Interscience, França), de um congelador de placas (Frigostrella, Brasil) e de um liofilizador de bancada (Edwards, E-C Micromodulyo Freeze Dryer, EUA) e uma bomba de vácuo (Savant, EUA).

Posteriormente, o produto obtido foi acondicionado em frascos de plástico com 30g, lacrado e rotulado, recebendo a denominação de uma unidade amostral.

2.2 - Determinação de ácido siálico

A determinação dos teores dos ácidos siálicos livres em ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de desenvolvimento foi realizada segundo a metodologia descrita por Warren (1959), utilizando uma centrífuga Beckman modelo Avanti™30 Centrifuge (Pablo Alto, California, EUA) e um espectrofômetro Milton Roy modelo Spectronic 1201 acoplado com um microregistrador (Quarry Bay, Hong Kong). Foram analisadas 3 unidades amostrais de cada dia de incubação.

2.3 - Delineamento estatístico

A casualidade para a escolha das unidades amostrais foi garantida pelo uso da tabela de números aleatórios¹³. Para análise estatística dos dados, foi aplicada a análise de regressão, utilizando os softwares STATISTICA for Windows versão 5.1 e SAS System for Windows versão 6.12.

3 – Resultados e discussão

Os teores médios dos ácidos siálicos livres em ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação podem ser observados na Figura 1.

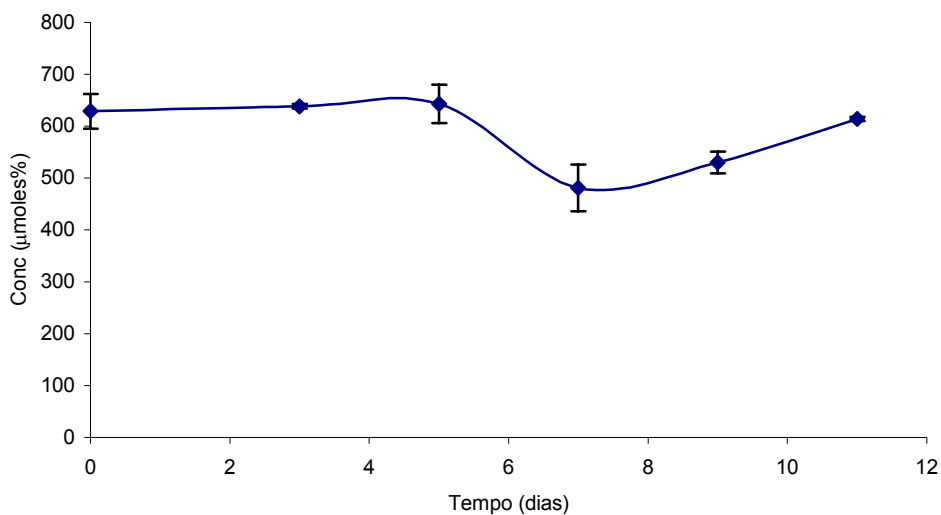


Figura 1: Teores médios dos ácidos siálicos livres em ovos de galinha embrionados e liofilizados versus diferentes dias de incubação.

De acordo com os resultados obtidos, os ovos férteis e embrionados apresentaram o seguinte teor médio de ácido siálico: $628,61 \pm 29,72$ μmoles% (dia 0), $638,38 \pm 4,11$ μmoles% (dia 3), $642,86 \pm 32,73$ μmoles% (dia 5), $480,83 \pm 39,72$ μmoles% (dia 7), $530,37 \pm 18,67$ μmoles% (dia 9) e $614,01 \pm 3,96$ μmoles% (dia 11). Estes resultados conferem com as médias de 566,67 e 400,00 μmoles% para clara e gema desidratadas, respectivamente, encontradas por Warren (1959).

Segundo Nakano *et al.* (1994), a concentração dos ácidos siálicos são: $13,7 \pm 0,5 \mu\text{g}/\text{mg}$ ($4400 \mu\text{moles}\%$) na membrana da gema; $5,1 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{mg}$ na chalaza ($1600 \mu\text{moles}\%$); $5,2 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{mg}$ ($1700 \mu\text{moles}\%$) na gema; $2,2 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{mg}$ ($700 \mu\text{moles}\%$) na clara e $0,6 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{mg}$ ($200 \mu\text{moles}\%$) nas membranas da casca.

Na Tabela 1 e Figura 2 estão representadas a análise de regressão e o diagrama de dispersão dos teores de ácidos siálicos em ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação.

Tabela 1: Análise de regressão dos teores dos ácidos siálicos em ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação.

Causas de variação	F	Valor p
linear	20,34	0,0007
quadrático	8,84	0,0116
cúbico	51,45	0,0001*

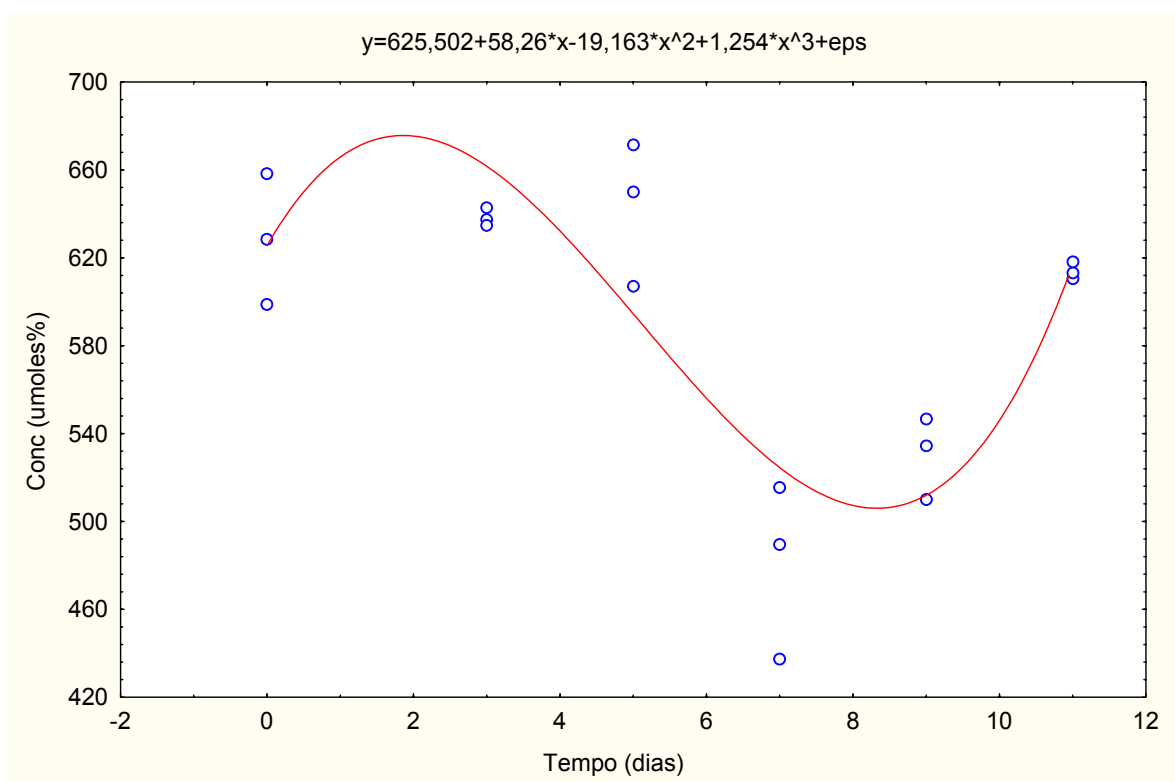


Figura 2: Diagrama de dispersão dos teores dos ácidos siálicos em unidades amostrais de ovos de galinha embrionados e liofilizados com diferentes dias de incubação.

Verifica-se na Tabela 1 e Figura 2 que há uma forte evidência estatística que o modelo cúbico está associado com os valores esperados dos teores dos ácidos siálicos ($p=0,0001$) que deu origem à seguinte equação:

$$\% \text{ de ácido siálico} = 625,502 + 58,26\text{dias} - 19,163\text{dias}^2 + 1,254\text{dias}^3$$

Entende-se que as diferenças de concentração desses ácidos, nos ovos embrionados durante a incubação, são devidas a modificações conformacionais e destruição de complexos. Sauveur⁸ menciona que a fração β da ovomucina é rica em ácido siálico, e que há diminuição desta fração logo após a postura atribuída à diminuição da clara e à aparição do complexo ovomucina-lisozima.

Os resultados permitem concluir que o desenvolvimento do embrião de galinha entre os dias 0 e 11 de incubação alteram os teores dos ácidos siálicos e o modelo cúbico está associado aos valores esperados. No 5º dia de incubação há uma diminuição dos teores destes ácidos pela diminuição e liquefação da clara, e destruição do complexo ovomucina-lisozima. Cabe salientar que estes ácidos estão ligados à proteína ovomucina e o papel desta proteína é proteger o embrião durante o seu desenvolvimento.

4 -Conclusão

Os ovos férteis e embrionados até o 5º dia de incubação demonstram ser fontes dos ácidos siálicos e apresentam potencialidades de desenvolvimento de uma nova classe de fármacos antivirais.

5 – Referências bibliográficas

1 -FEENEY Robert E.; RHODES, Marvin P.; ANDERSON, John S. The distribuion and role of sialic acid in chicken egg white. **The Journal of Biological Chemistry**, v.235, n.9, p.2633-2637, 1960.

2 - FUKUDA, Sandra Pereira. **Estudo de metodologia quantitativa para a determinação espectrofotométrica de ácido siálico em leite**. 1994. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

3 - HARDY, Charles T.; YOUNG, Sarah A.; WEBSTER, Robert G.; NAEVE, Clayton W.; OWENS Randall J. Egg fluids and cells of the chorioallantoic mebrane of embryonated chicken eggs can select different variants of Influenza A (H3N2) viruses. **Virology**, v.211, n.1, p.302-305, 1995.

- 4 - HARTMANN, C.; WILHELMSON, M. The hen's egg yolk: a source of biologically active substances. **World's Poultry Science Journal**, v.57, p.13-28, 2001.
- 5 -INOUE, Yasuo; INOUE, Sadako. Diversity in sialic and polysialic acid residues and related enzymes. **Pure Appl. Chem.**, v.71, n.5, p.789-800, 1999.
- 6 -NAKANO, K.; NAKANO, T.; AHN, Du; SIM, J. S. Sialic-acid contents in chicken eggs and tissues. **Canadian Journal of Animal Science**, v.74, n 4, p.601-606, 1994.
- 7 - SALATIN, Joel. **Pastured poultry profits**. Virginia (USA): Polyface Swoope, 1993. 330p.
- 8 - SAUVEUR, B. Relation entre les acides sialiques de l'ovomucine et la hauteur du gel d'albumen de l'oeuf. **Journées de Recherches Avicoles et Cunicoles**, p. 311-315, 1973.
- 9 - SEKO, Akira; KOKETSU, Mamoru; NISHIZONO, Masakazu; ENOKI, Yuko; IBRAHIM, Hisham R.; JUNEJA, Lekh Raj; KIM, Mujo; YAMAMOTO, Takehiko. Occurrence of sialylglycopeptide and free sialylglycans in hen's egg yolk. **Biochemica et Biophysica Acta**, v.1335, n.1/2, p.23-32, 1997.
- 10 - SPEAKE, Brian. K.; MURRAY, Alison. M. B.; NOBLE, Raymond. C. Transport and transformations of yolk lipids during development of avian embryo. **Prog. Lipid Res.**, v.37, n.1, p.1-32, 1998.
- 11 - STADELMAN, W. J. World's poultry science association invited lecture: The incredibly functional egg. **Poultry Science**, n. 78, p.807-811, 1999.
- 12 - THAPON, Jean-Louis; BOURGEOIS Claude-Marcel. **L'oeuf et les ovoproduits**. Paris (France): Lavoisier - Technique et Documentation, 1994. 344p.
- 13 - VIEIRA, S., HOFFMANN, R. **Estatística experimental**. São Paulo: Atlas, 1989. 179p.
- 14 - WARREN, Leonard. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. **The Journal of Biological Chemistry**, v.234, n.8, p.1971-1975, 1959.